

Immuncytochemischer
und elektrophysiologischer Nachweis
von Transmittern im Komplexauge
von *Calliphora erythrocephala*

Karl-Heinz Datum



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554624_0023

Immuncytochemischer und elektrophysiologischer
Nachweis von Transmittern im Komplexauge von
Calliphora erythrocephala

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Karl-Heinz Datum

München 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Zettler
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Neuweiler
- Tag der mündlichen Prüfung: 19. 5. 1987

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Universität München in der Arbeitsgruppe von Prof.F.Zettler angefertigt.

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben danke ich herzlich.

Vor allem möchte ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe und dabei im besonderen Herrn Prof. F.Zettler danken.

Herrn Prof. R.Weiler bin ich für seine Anregungen dankbar.

Die Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	Seite 1
2.	MATERIAL UND METHODEN	
2.1	Tiermaterial	7
2.2	Elektrophysiologie	
2.2.1	Präparation	
2.2.2	Elektroden	8
2.2.3	Versuchsaufbau	
2.2.4	Wahl der Applikationsmethode	10
2.2.5	Superfusion	11
2.2.6	Lösungen	12
2.3	Immuncytochemie	13
2.3.1	Allgemeine Durchführung	
2.3.2	Immuncytochemische Methode	16
2.3.2.1	PAP-Methode	
2.3.2.2	ABC-Methode	17
2.3.3	Verminderung des Background	
2.3.4	Kontrollexperimente	18
2.3.4	Konjugatherstellung	19
2.3.5	Spezielle Immuncytochemie	20
2.4	Histochemie	22
2.4.1	Acetylcholinesterase (AChE)	
2.4.2	6-Hydroxydopamin (6-OHDA)	23
3.	ERGEBNISSE	
3.1	Cholinerge Zellen	24
3.1.1	Immuncytochemie	
3.1.1.1	Übersicht	
3.1.1.2	Photorezeptoren R1-R6	25
3.1.2	Acetylcholinesterase-Histochemie	27
3.1.3	Allgemeine Vorbemerkungen	
	zur Elektrophysiologie	30
3.1.3.1	Verschaltung und lichtinduzierte	
	Antworten von R1-R6 und L1-L2	
3.1.3.2	Intrazelluläre Ableitungen mit	
	Superfusion	

3.1.4	Intrazelluläre Ableitungen mit pharmakologischer Beeinflussung der cholinergen Transmission	33
3.1.4.1	Auswahl der Pharmaka	
3.1.4.2	Acetylcholin	34
3.1.4.3	Eserin	36
3.1.4.4	Decamethonium	39
3.1.4.5	Curare	42
3.1.4.6	α -Bungarotoxin	45
3.1.4.7	Atropin, Hexamethonium, Hemicholinum 3, Strychnin	46
3.2	GABAerge und GAD-positive Zellen	48
3.2.1	Immuncytochemie	
3.2.1.1	Übersicht	
3.2.1.2	Kontrollexperimente	50
3.2.1.3	Photorezeptoren R7-R8	53
3.2.1.4	Zentrifugale C2 Zellen	57
3.2.2	Intrazelluläre Ableitungen mit pharmakologischer Beeinflussung der GABAergen Transmission	64
3.2.2.1	Pikrotoxin	
3.2.2.2	Bicucullin, Imipramin	66
3.3	Dopaminerge Zellen	68
3.3.1	Immuncytochemie	
3.3.1.1	Übersicht	
3.3.1.2	Photorezeptoren R7-R8	70
3.3.1.3	Monopolaren L1-L2	73
3.3.1.4	Immuncytochemie dopaminerger Strukturen nach 6-OHDA Injektion	74
3.4	Immuncytochemie von Glucagon, Met- Enkephalin, Neurotensin	79
4.	DISKUSSION	
4.1	Cholinerge Zellen	81
4.2	GABAerge Zellen	89
4.3	Dopaminerge Zellen	94
5.	ZUSAMMENFASSUNG	99
6.	LITERATUR	103

1. EINLEITUNG

Zur Aufklärung des neuronalen Aufbaus der Komplexaugen von Dipteren haben viele Untersuchungen mit der Golgi-Methode oder mit einer anderen Silberfärbungsmethode beigetragen (Cajal and Sánchez 1915; Trujillo-Cenoz und Melamed 1970; Strausfeld 1971, 1976). Sechs Photorezeptorenaxone R1-R6, die 6 verschiedenen benachbarten Ommatidien entstammen, projizieren auf eine Cartridge des 1. optischen Ganglions, der Lamina ganglionaris (Braitenberg 1967; Kirschfeld 1967). Die beiden zentral angeordneten Photorezeptoren R7/8 ziehen durch die Lamina hindurch um im 2. optischen Ganglion, der Medulla, zu enden (Campos-Ortega und Strausfeld 1972). Lamina und Medulla werden sowohl durch afferente als auch durch efferente Fasern miteinander verbunden (Strausfeld 1971, 1976). Zu den afferenten Zellen einer Cartridge gehören die Monopolaren L1-L5 deren Zellkörper distal der Lamina liegen.

Die Monopolaren L1-L2 zeigten sich in EM-Studien als postsynaptisch zu den Photorezeptoren R1-R6 (Trujillo-Cenoz 1965; Boschek 1971). In jeder Cartridge bestehen dabei ca. 1200 synaptische Verbindungen zwischen den Photorezeptoren und den postsynaptischen L1-L2 Monopolaren (Nicol und Meinertzhagen 1982). Als weitere postsynaptische Elemente von R1-R6 konnten die Monopolare L3 und die α -Fasern von Amakrinzellen ausgemacht werden (Burkhardt und Braitenberg 1976).

Von den 15 bekannten Zelltypen der Lamina konnte bisher nur von den Axonen aller Photorezeptoren und von den Monopolaren L1-L2 reproduzierbar abgeleitet werden (DeVoe 1985). Die Photorezeptoren R1-R6 antworten auf einen Lichtreiz mit einer graduierten Depolarisation (Burkhardt und Autrum 1960). Die postsynaptischen Monopolaren zeigen als Antwort auf die Lichtreizung eine Hyperpolarisation (Shaw 1968; Autrum et al. 1970; Järvilehto und Zettler 1971; Zettler und Weiler 1976).

Im Gegensatz zu der großen Anzahl morphologischer als auch elektrophysiologischer Studien sind nur verhältnismäßig wenige Untersuchungen zur neuronalen Transmitterlokalisation in der Lamina bekannt. Früher durchgeführte Untersuchungen bedienten sich dabei, wie im Falle des Nachweises monoaminergen Zellen (Elofsson und Klemm 1972; Klemm und Axelsson 1973) der Histochemie oder auch autoradiographischer Untersuchungen zur Aufnahme von markierten Transmittern, wie z. B. von γ -Aminobuttersäure (GABA) zur Lokalisation GABAerger Zellen in *Drosophila melanogaster* und *Musca domestica* (Campos-Ortega 1973). Erst in der letzten Zeit rückte die Immuncytochemie als Instrument zur Lokalisation kleiner Transmittermoleküle, auch bei Untersuchungen an Arthropoden, mehr in den Vordergrund. Immuncytochemisch konnten in der Lamina verschiedener Dipteren GABAerge Zellen lokalisiert werden (Datum et al 1986; Meyer et al 1986). Ebenfalls durch immuncytochemischen Nachweis konnte auch eine bis zu diesem Zeitpunkt nicht bekannte Zelle in der

Lamina von *Calliphora erythrocephala* als serotonerg beschrieben werden (Nässel und Klemm 1983; Nässel et al. 1983). Eine erste Untersuchung zur Verteilung von Cholin Acetyl Transferase (ChAT) mit Hilfe der Immunocytochemie bei *Drosophila melanogaster* zeigte ChAT-positive Strukturen in der Lamina (Buchner et al. 1986). Keine immunocytochemische Untersuchung konnte jedoch bisher die Frage nach dem möglichen Transmitter der präsynaptischen Photorezeptoren R1-R6 klären.

Hinweise auf einen Photorezeptor-Transmitter lieferten dahingegen elektrophysiologische Untersuchungen von "second-order" Zellen verschiedener Arten.

Koike (1983) schloß aus seinen Untersuchungen der Photorezeptoren sowie der I-Zellen von *Balanus nubilus*, die beide ähnliche Potentiale wie R1-R6 bzw. L1-L2 als Lichtantwort generieren, daß GABA der Transmitter des Photorezeptors der Entenmuschel sei. Diese Ansicht konnte aber in anderen Untersuchungen im selben System nicht bestätigt werden (Timpe und Stuart 1984). Intrazelluläre Ableitungen der Monopolaren L1-L2 der Fleischfliege, bei gleichzeitiger neuropharmakologischer Blockade der GABAergen Transmission, führten Zimmerman (1978) dazu GABA als den möglichen Transmitter der Photorezeptoren R1-R6 anzusehen.

Als alternative, mögliche Transmittersubstanz von R1-R6 kommt Acetylcholin in Betracht. Acetylcholin ist von vielen Invertebraten her als Transmitter sensorischer Zellen bekannt (Barker et al. 1972; Sattelle 1980, 1985).

Der wohl bekannteste cholinerge sensorische Eingang, der zugleich eines der am besten untersuchten cholinergen Systeme in Invertebraten darstellt, ist der cercale Mechanorezeptor der Schabe der präsynaptisch auf ein "giant interganglionic interneurone" im terminalen Abdominalganglion wirkt (Callec 1985).

Hinweise auf Acetylcholin als inhibitorischer Transmitter der Photorezeptoren sind unterschiedlichen Ursprungs. Die wohl am offensichtlichsten auf ACh verweisende Untersuchung ist dabei im ocellaren Sehsystem der Libelle durchgeführt worden. Die ocellaren Photorezeptoren und die ocellaren Nervendriten (OND) zeigen dabei licht-induzierte Antworten, die große Ähnlichkeit mit den Antworten der Photorezeptoren R1-R6 bzw. der Monopolaren L1-L2 aufwiesen. Badappliziertes Curare führte zur vollständigen Blockade der postsynaptischen OND-Antwort (Klingman und Chappell 1978). Auch bei der Lichtantwort der L-Neurone des Heuschreckenocellus, die vergleichbar mit der OND-Antwort ist, konnte die On-Antwort durch Curare unterdrückt werden (Ammermüller und Weiler 1985). Weitere Hinweise auf Acetylcholin bilden ERG Ableitungen bestimmter Drosophilamutanten. ERG Ableitungen von Tieren, die keine Acetylcholinesteraseaktivität in der Lamina aufwiesen, zeigten Anomalien (Greenspan et al. 1980). Ebenfalls abnorme ERG Ableitungen waren in Mutanten, die temperatursensitive Cholin Acetyl Transferase besaßen, beobachtbar (Greenspan 1980).

In der vorliegenden Arbeit sollte diesen Hinweisen mit zwei unterschiedlichen Ansätzen nachgegangen werden. Zum einen sollte die Lokalisation präsumtiver Transmittersubstanzen in der Lamina von *Calliphora erythrocephala* auf immuncytochemischem Wege erfolgen. Verbunden mit diesem immuncytochemischen Ansatz war der Anspruch die Lokalisation einer bestimmten Transmittersubstanz, so weit als möglich, durch weitere Versuche abzusichern. Beispiele hierfür stellen zum einen der immuncytochemische Nachweis des GABA synthetisierenden Enzyms Glutamatdecarboxylase (GAD), und zum anderen der histochemische Nachweis von Acetylcholinesterase (AChE) dar.

Gleichzeitig mit diesen morphologischen Untersuchungen sollte jedoch ein zweiter, physiologischer Ansatz verbunden sein. Dieser Ansatz wurde durch intrazelluläre Ableitungen von Monopolaren L1-L2 unter neuropharmakologischer Beeinflussung bzw. Blockierung der Transmission des zu untersuchenden individuellen Transmitters verwirklicht.

Die zunächst erarbeitete immuncytochemische Lokalisation von GABA und ACh in unterschiedlichen, jedoch eindeutig zu den Monopolaren präsynaptischen Zellen führte zu einer intensiveren Untersuchung speziell dieser beiden Systeme in elektrophysiologischer bzw. neuropharmakologischer Hinsicht.

Diese vertiefte Untersuchung wurde zudem noch unter einem weiteren Aspekt angegangen. Die postsynaptischen

Rezeptoren der Arthropoden sowohl für GABA als auch für ACh scheinen sich von denen der Vertebraten in ihren pharmakologischen Eigenschaften zu unterscheiden. So sind z. B. durch Bindungsstudien in Dipteren 3 verschiedene ACh-Rezeptortypen mit unterschiedlichem pharmakologischem Profil nachgewiesen (Donnellan et al. 1975; Mansour et al. 1977; Schmidt-Nielsen et al. 1977; Dudai 1977; Dudai und Ben-Barak 1977; Rudloff 1978; Dudai 1980; Eldefrawi und Eldefrawi 1980; Jones et al. 1981; Jones und Sumikawa 1981).

Auch die GABA-Rezeptoren der Arthropoden zeigen ein etwas anderes pharmakologisches Profil als die GABA-Rezeptoren von Vertebraten (Simmonds 1983; Breer und Heiligenberg 1985; Lunt et al. 1985). Die neuropharmakologische Beeinflussung der GABAergen bzw. der cholinergen Transmission sollte deshalb auch unter dem Gesichtspunkt einer pharmakologischen Typenzuordnung des postsynaptischen Rezeptors erfolgen.

Auch die Verteilung anderer präsumtiver Transmittersubstanzen der Lamina sollte immunocytochemisch untersucht werden.

2.MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten Fliegen der Art *Calliphora erythrocephala*. Verwendet wurden sowohl Fliegen aus der Zucht des Zoologischen Instituts der Universität München als auch Wildfänge aus der Umgebung Münchens. Die Fliegen wiesen zum Zeitpunkt der Versuche ein Imaginalalter von 8 bis 18 Tagen auf. Die immuncytochemischen und histochemischen Experimente wurden mit Männchen und Weibchen durchgeführt, während für die elektrophysiologischen Versuche Männchen verwendet wurden.

2.2 Elektrophysiologie

2.2.1 Präparation

Zur Präparation wurde der Kopf vom Körper abgetrennt und die linke Hälfte der Hinterhauptswand entfernt. Die der Lamina anhaftenden Luftsackmembranen wurden entfernt, um einerseits ein frühzeitiges Abbrechen der Elektroden spitze zu verhindern und andererseits eine schnellere Diffusion der Pharmaka zu ermöglichen. Der Kopf wurde dann am Wachsboden einer Superfusionskammer aus Plexiglas festgesteckt, sodaß zwischen Kammerboden und Hinterhauptswand des Kopfes ein Winkel von 45° bis 55° eingeschlossen wurde. Die Kammer wurde vor Versuchsbeginn

soweit mit Ringer gefüllt, daß die Lamina ganglionaris gerade von der Flüssigkeit bedeckt war.

2.2.2 Elektroden

Die Elektroden für die intrazelluläre Ableitung wurden aus Glaskapillaren aus Borosilicatglas (Clark GC 150 F) auf einem Horizontalziehgerät gezogen. Sie wurden von hinten mit 2 M Kaliumacetatlösung gefüllt. Elektroden mit, in Ringer gemessenen, Widerständen von 80 M Ω bis 120 M Ω gewährleisteten stabile intrazelluläre Ableitungen von monopolaren Neuronen L1 und L2. Der Ableitort war im ventralen Drittel des Chiasma oder der Lamina gelegen.

2.2.3 Versuchsaufbau

Zellpotentialänderungen wurden mittels eines Verstärkers mit FET-Eingang abgeleitet. Schwankungen des Potentials während des Lösungswechsels wurde durch eine Agar-Ringer-Brücke zwischen indifferenten Elektrode und Bad verhindert. Der Verstärkerausgang war mit einem Oszillographen (Tektronix 502 A) verbunden und wurde auf einem Tonband (Teac R 71) aufgezeichnet. Zur Auswertung konnten die Tonbandaufzeichnungen über einen Schreiber (Gould 220) oder einen Speicheroszillographen (Gould 1421) wiedergegeben werden (Abb.1).

Das Fliegenauge wurde mittels einer 150 W XBO Lampe belichtet. Das Licht war auf das eine Ende eines

XL = XBO-Lampe	GF = Graufiltersatz
V = Verschuß	FZ = Fotozelle
LL = Lichtleiter	LR = Radius des Lichtleiters
PK = Präparatekammer	R = Ringer
SP = Spritze	MV = Motorvortrieb für Spritzen
STM = Steuerung (Motorvortrieb)	H = Hahn für Lösungswechsel
AE = Ableitelektrode	IE = Indifferente Elektrode
VS = Verstärker	OSZ = Oszillograph
IG = Impulsgenerator erzeugt	VI = Verschußsteuerungsimpuls
und	TR = Triggerimpuls
SOSZ = Speicheroszillograph	SCH = Schreiber

2.2.4 Wahl der Applikationsmethode

Um synapsensensitive Pharmaka zu applizieren bieten sich 2 Möglichkeiten an. Eine davon ist die iontophoretische Applikation (oder auch die Druckapplikation) von Pharmaka durch eine zweite Elektrode die nahe der Ableitelektrode oder nahe der zu beeinflussenden Synapse positioniert werden muß. Die zweite Möglichkeit besteht in der Badapplikation von Pharmaka. Die wenig reproduzierbaren Ergebnisse von Monopolarzellableitungen mit iontophoretischer Pharmakaapplikation zeigten jedoch, daß die Injektionselektrode nicht mit der nötigen Genauigkeit justiert werden konnte. Deshalb wurde die Pharmaka über eine Badlösung appliziert. Die Methode der Badapplikation von Pharmaka ermöglicht, im Gegensatz zur iontophoretischen Applikation, eine genauere Bestimmung der applizierten Pharmakonkonzentration.

Bei der Badapplikation von Pharmaka müssen jedoch einige Punkte beachtet werden.

1. Das applizierte Pharmakon wirkt ubiquitär auf alle sensitiven Zellen.
2. Aufgrund der Diffusionszeit erreicht die Pharmakonkonzentration an der transmitterrezeptiven Zellmembran nur langsam die Pharmakonkonzentration des Bades. Im Fall der Applikation von Agonisten kann deshalb eine Desensibilisierung der Transmitter-Rezeptoren auftreten.
3. Die Pharmakonkonzentration im Extrazellulärraum kann von der Konzentration im Bad abweichen (Sattelle 1980).

Die mögliche Desensibilisierung der Transmitter-Rezeptoren durch badapplizierter Agonisten sowie deren ubiquitäre Wirkung implizieren, daß ihre Wirkungen, gerade in einem so dicht gepackten synaptischem Netzwerk wie der Lamina ganglionaris, kaum einer differenzierten Interpretation zugänglich sind. Deshalb wurden die intrazellulären Monopolarableitungen meist unter der Applikation bekannter Antagonisten durchgeführt.

Der Lösungswechsel bei der Badapplikation von Pharmaka stellt jedoch eine mechanische Störung des Ableitvorgangs dar, die möglichst klein gehalten werden muß. Deshalb wurde zum Lösungswechsel ein motorgetriebenes Spritzen-system verwendet. Dieses System ermöglichte eine Minimierung der Flüssigkeitsspiegelschwankungen und reduzierte zudem die durch die Flüssigkeitsströmung hervorgerufene mechanische Störung.

2.2.5 Superfusion

Die Kammer (Volumen ca. 0,3 ml) war über zu- und ab-führende PVC-Schläuche (Volumen ca. 0,3 ml) im Kammer-boden mit zwei 2 ml Spritzen verbunden. Versuche mit Wechsel von Farblösungen hatten gezeigt, daß für einen vollständigen Lösungsaustausch in der Superfusionskammer ein Wechsel von 2 ml nötig war. Die beiden Spritzen waren so miteinander gekoppelt, daß eine Spritze immer das gleiche Volumen aus der Kammer abführte das die andere Spritze zuführte. Der Antrieb der Spritzen erfolgte über

einen Motor, der eine stufenlose Regelung des Flüssigkeitszuflusses bzw. Abflusses von $0,05 \text{ ml min}^{-1}$ bis zu $2,4 \text{ ml min}^{-1}$ ermöglichte. Das System war nur für die Dauer des Lösungswechsels in Betrieb. Die meisten Experimente wurden mit einer Lösungswechselgeschwindigkeit von $0,35 \text{ ml min}^{-1}$ durchgeführt. Einige wenige Experimente erlaubten Geschwindigkeiten bis zu $0,6 \text{ ml min}^{-1}$. Um ein Absinken des Flüssigkeitsspiegels, aufgrund von Verdunstung während des Versuches, zu verhindern war die Superfusionskammer von einer zweiten Feuchtigkeitskammer aus Plexiglas umgeben. Beide Kammern wurden zudem durch eine dünne Plexiglasscheibe abgedeckt die nur sektorartig geöffnet war um die Einführung der Elektrode und deren binokulare Kontrolle zu ermöglichen.

2.2.6 Lösungen

Der verwendete Normalringer hatte folgende Zusammensetzung:

NaCl	170 mM
KCl	5 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	2 mM
Saccharose	14 mM
TES	10 mM

Der pH-Wert von 6,5 wurde mit $0,5 \text{ n NaOH}$ eingestellt. Die verwendeten Pharmaka wurden direkt in Ringer gelöst. Zur Herstellung 10^{-2} M Pharmakalösungen wurde ein Ringer mit auf 4 mM verringerter Saccharosekonzentration verwendet. Der pH-Wert aller verwendeten Pharmaka-Ringer-Lösungen

war 6,5. Die verwendeten Pharmaka waren für die Beeinflussung

a) der GABAergen Transmission:

Bicucullin Methjodid, Imipramin und Pikrotoxin

b) der cholinergen Transmission:

Acetylcholinjodid, α -Bungarotoxin, Atropinsulfat
Decamethoniumbromid, d-Tubocurarinchlorid, Eserin
Hemisulfat (Physostigmin), Hemicholinum 3, Hexa-
methoniumchlorid und Strychnin.

Sämtliche oben angeführte Pharmaka wurden von SIGMA Chemical Co. bezogen.

2.3 Immuncytochemie

2.3.1 Allgemeine Durchführung

Die verwendeten Antikörper wurden aus verschiedenen Quellen bezogen. Der GAD I Antikörper war ein Geschenk von Dr. Brandon, Chicago; der GAD II Antikörper war ein Geschenk von Dr. Oertel, München. Die Antikörper gegen GABA, Dopamin, Neurotensin, Glucagon und Metenkephalin wurden von Immuno Nuclear Company und der Acetylcholin-Antikörper von SFRI Laboratoire bezogen.

Die Herstellung von Antikörpern gegen kleine Transmittermoleküle erfolgt über die Kopplung dieser an Trägerproteine z. B. mittels Glutaraldehyd. Die Wahl einer geeigneten Fixierung ist deshalb in der Immuncytochemie einer der wichtigsten Schritte. Die

Fixierung soll das zu detektierende Transmittermolekül in die Antigenform bringen, die der gegen den Transmitter gerichtete Antikörper am besten erkennt.

Fixierung, Puffersystem und Verdünnung des primären Antikörpers waren deshalb für die einzelnen angewendeten Antikörper unterschiedlich, die folgenden Schritte waren jedoch für alle Antikörperanwendungen gleich.

Der an der Hinterhauptswand eröffnete Fliegenkopf wurde für ca. 1 h bei Raumtemperatur in das jeweilige Fixativ gegeben. Nach zweimaligem Waschen im entsprechenden Puffersystem (je 15 min) wurde der Fliegenkopf in eine 1% Natriumborohydrid (NaBH_4) Lösung für 1 h eingebracht um freie Aldehydgruppen abzusättigen. Dieser Schritt unterblieb bei der Immuncytochemie von Neuropeptiden. Nach weiterem zweimaligem Waschen für je ca. 15 min in dem entsprechenden Puffersystem wurde das Gewebe in 25% Saccharose-Pufferlösung eingebracht, die die Bildung größerer Eiskristalle beim später erfolgenden Einfrieren des Gewebes vermindern soll. In der Saccharoselösung verblieb das Gewebe für mindestens 12 h bei 4° C.

Das Gewebe wurde daran anschließend in Cryomatrix (Shandon bzw Reichert-Jung) mit flüssigem N_2 eingefroren. Gefrierschnitte in horizontaler oder frontaler Ebene des Fliegenauges mit einer Dicke von 18 μm bis 25 μm wurden auf gelatinierte Objektträger aufgebracht. Diese OT's wurden für ca. 2 h auf eine Wärmeplatte (30° C bis 37° C) gelegt, um eine gute Anhaftung der Schnitte zu gewährleisten. Nach dem Auswaschen des Einbettungsmediums

und einer möglichen Inkubation in Lösungen, die den Background vermindern , wurde das Gewebe den Antikörperreaktionen unterworfen.

Der primäre Antikörper wurde für mindestens 18 h bei 4° C in Verdünnungen von 1:750 bis 1:3000 inkubiert. Der zweite Antikörper wurde bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:100 (PAP) bzw. 1:200 (ABC) 1 h bis 2 h inkubiert. Der Avidin-HRP (Horseradish peroxidase)-Komplex im Falle der ABC-Methode bzw. der PAP-Antikörper-Komplex im Falle der PAP-Methode wurden in einer Verdünnung von 1:100 ebenfalls bei Raumtemperatur für 1h bis 2 h inkubiert. Alle oben angeführten Schritte wurden durch zweimaliges Waschen (10 min) im jeweiligen Puffersystem unterbrochen.

Die Schnitte wurden nach abschließendem Waschen in TRIS Puffer (0,05 M, pH=7,5) für 15 min bis 30 min in einer Lösung aus 0,05% 3-3' Diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB) als Chromogen und 0,01% H₂O₂ als Peroxidasesubstrat inkubiert. Die Einbettung des Gewebes erfolgte in einer Glycerin-Puffer-Lösung (6:4).

2.3.2 Immuncytochemische Methode

2.3.2.1 PAP-Methode

Die PAP-Methode (Sternberger 1979) verwendet drei Antikörper (Abb.2). Der primäre Antikörper richtet sich gegen das nachzuweisende Antigen. Der zweite Antikörper ist gegen die Immunglobuline der Art gerichtet, die den primären Antikörper produziert hat. Von dieser Art stammt auch der dritte Antikörper, der gegen Peroxidase gerichtet ist und bereits an HRP gebunden ist. Da der zweite Antikörper im Überschuß zugegeben wird, besitzt er genügend freie Bindungsstellen um auch den dritten Antikörper zu binden.

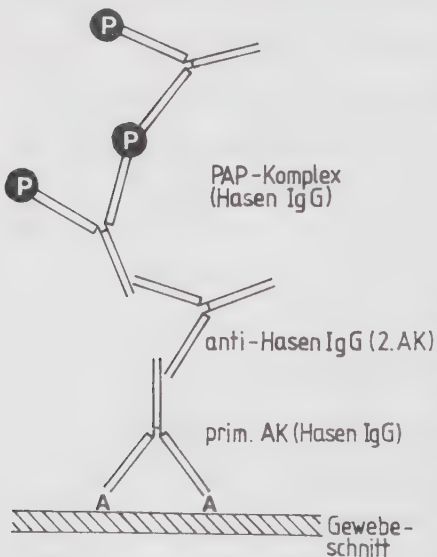


Abb.2 Schematische Darstellung der PAP-Methode

Der primäre Antikörper, im Hasen gewonnen, ist spezifisch gegen das Antigen (A) des Gewebes gerichtet. Mit dem zweiten Antikörper (2.AK) wird der primäre und der PAP-Komplex gebunden. Der PAP-Komplex besteht aus der Antiperoxidase (Hasen Ig G) und der bereits gebundenen Peroxidase (P).

2.3.2.2 ABC-Methode

Die ABC-Methode (Hsu et al. 1981) ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Sie beruht auf der großen Affinität des Glycoproteins Avidin zu Biotin. Der zweite Antikörper ist mit mehreren Molekülen Biotin gekoppelt. Avidin ist in der Lage mehrere Moleküle Biotin zu binden. Ein Avidin-Biotinyl-HRP-Komplex bindet dabei an das Biotin des zweiten Antikörpers.

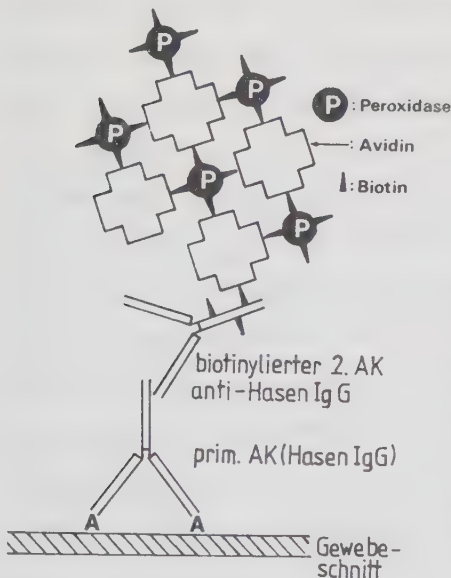


Abb.3 Schematische Darstellung der ABC-Methode

An den primären Antikörper, der gegen das Antigen (A) gerichtet ist, bindet der biotinylierte zweite Antikörper. Avidin hat 4 Bindungsstellen für Biotin. Die Peroxidase (P) - z. B. HRP - kann wie viele Enzyme und Antikörper mit mehreren Moleküle Biotin gekoppelt werden

2.3.3 Verminderung des Backgrounds

Eine erhöhte Backgroundfärbung kann ihren Ursprung in nichtspezifischen immunologischen Reaktionen der Antikörper oder in oft durch die Fixation bedingten Gewebe-

reaktionen mit der DAB-H₂O₂ Lösung haben.

Eine hohe Verdünnung des primären Antikörpers vermindert nichtspezifische immunologische Reaktionen.

Nichtspezifischen Reaktionen, die auf den zweiten Antikörper zurückzuführen sind, kann man dadurch begegnen, daß man das Gewebe mit Serum inkubiert, das von der, den zweiten Antikörper produzierenden Art stammt. Das Serum wird auch jeweils in einer Endkonzentration von 5% bzw 2% dem primären bzw. dem sekundären Antikörper beigefügt. Alle verwendeten zweiten Antikörper, bis auf den zweiten Antikörper der GAD II Immuncytochemie, wurden aus der Ziege gewonnen, sodaß mit NGS (normal goat serum) präinkubiert wurde.

Unerwünschte Gewebereaktionen werden durch die Inkubation mit Natriumborhydrid unterdrückt. NaBH₄ hydriert freie Aldehydgruppen und verhindert damit eine Dehydrierung von DAB an Gewebestellen die kein Antigen enthalten.

NaBH₄ reduziert zudem Doppelbindungen im Transmitter-Glutaraldehyd-Protein-Komplex und führt somit oft erst zu einem für den primären Antikörper erkennbaren Gewebsantigen (Geffard et al.1984; Campistron et al.1986a, 1986b).

2.3.4 Kontrollexperimente

Um falsche positive Färbungen durch Gewebereaktionen mit DAB auszuschließen wurde das Gewebe ohne Aufbringen von Antikörpern mit der DAB-H₂O₂-Lösung gefärbt.

Um falsche positive Färbungen, die durch den 2. Antikör-

per hervorgerufen werden, zu erkennen, wurden immuncytochemische Färbungen ohne Aufbringen des primären Antikörpers durchgeführt.

Zum Nachweis spezifischer Reaktionen des primären Antikörpers wurden Präabsorptionsexperimente durchgeführt. Zur Absicherung einer haptenspezifischen Reaktion des primären Antikörpers wurde dieser mit dem bei der Haptenkopplung verwendeten Trägerprotein, bzw. mit dem Glutaraldehyd-Trägerprotein-Konjugat, bei Raumtemperatur für 2 h präinkubiert. Die Spezifität des primären Antikörpers wurde durch Präabsorption mit dem nachzuweisenden Antigen untersucht. Zusätzliche Experimente untersuchten die Immunfärbung nach Präabsorption des primären Antikörpers mit anderen Antigenen. Im Falle von GABA, Acetylcholin und Dopamin stellten Konjugate dieser Substanzen mit dem Trägerprotein Rinder Serum Albumin (BSA) das Antigen.

2.3.5 Konjugatherstellung

Für die Präabsorption wurden die Konjugate von GABA, Glycin und Dopamin in Anlehnung an beschriebene Methoden (Geffard et al. 1984; Campistron et al. 1986b) nach dem folgenden Rezept hergestellt.

- 10 mg Aminosäure bzw Dopamin werden in 1ml H₂O dest. gelöst.
- Diese Lösung wird mit 20 mg BSA (SIGMA, RIA grade) in 1 ml 0,2 M Sörensen Phosphatpuffer (NaPP) pH=7,4

gemischt.

- Dazu gibt man 1ml einer 5% Glutaraldehydlösung (SIGMA, grade I).
- Nach 5 min Reaktionszeit wird 1 ml einer 50 mM NaBH₄-Lösung in 0,2 M NaPP zugegeben.
- Die so erhaltene Lösung wird 48 h bei 4° C dialysiert
- Unlösliche Anteile werden durch Zentrifugation abgetrennt.

Zur Herstellung eines BSA-Glutaraldehyd Konjugats (BSA-GA) geht man mit Ausnahme der ersten beiden Schritte wie oben angegeben vor. Die ersten beiden Schritte werden ersetzt durch

- 30 mg BSA werden in 2 ml 0,1 M NaPP gelöst.

Das Acetylcholin konjugat wurde folgendermaßen hergestellt

- 20 mg BSA werden in 2 ml 0,1 M NaPP pH=8,2 gelöst.
- Dazu werden nacheinander 100 µl Allylalkohol und 100µl 25% Glutaraldehydlösung gegeben.
- Nach 5 min Reaktionszeit werden 0,8 ml einer 50 mM NaBH₄-Lösung in 0,1 M NaPP zugegeben.
- Nach 48 stündiger Dialyse bei 4° C und Zentrifugation enthält der Überstand das Konjugat.

2.3.6 Spezielle Immuncytochemie

Der GAD II Antikörper wurde in der Ziege gewonnen. Alle anderen verwendeten Antikörper stammen aus dem Hasen.

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Durchführung der Immuncytochemie im einzelnen.

Antikörper	GABA	GAD I	GAD II	ACh	Dopamin	Neurotensin; Metenk., Glucagon
Fixativ	1h in A: 4% PF; 0,05% GA 0,1 M PP pH=7,4 3% Saccharose oder 1h in B: 2% PF; 1% GA; 0,05 M PP pH=7,4 in 2% PF; 0,05 M PP pH=8,5	20 min in 2% PF; 0,03% GA; dann 1h in 2% PF; 0,03% GA; 0,05 M PP pH=8,5 dann 0,5h - 1h in 2% PF; 0,05 M PP pH=8,5	1h in 4% PF; 0,05% GA; 0,1 M PP pH=7,4 3% Sucrose	10 min in 0,1 M Cacop pH=6,5; 1% SMB dann 15 min in 0,075 M Cacop 1 M Allylalkohol 5% GA; 1% SMB; pH=10 dann 45 min in 0,075 M Cacop 5% GA; 1% SMB; pH=7,4	10 min in 0,1 M Cacop pH=6,5; 1% SMB dann 15 min in 0,075 M Cacop 1 M Allylalkohol 2% PF; 1% GA; 1% SMB; pH=10 dann 45 min in 0,075 M Cacop 2% PF; 1% GA; 1% SMB; pH=7,4	1h in 4% PF; 3% Sucrose 0,1 M PP pH=7,4
Waschpuffer	0,1 M PP	0,1 M PP	0,1 M PP	0,05 M Trisp. pH=7,5; 0,85% SMB	0,05 M Trisp. pH=7,5; 0,85% SMB	PBS
NABH ₄	λ)nein/B)ja	nein	nein	ja	ja	nein
Präinkubation	10% NGS	10% NGS	nein	10% NGS	10% NGS	nein
Verdünnungspuffer für 1. Antikörper	PBS; 5% NGS 0,1%-0,3% Tr. X	KPBS; 5% NGS 0,05% Triton X	PBS; 0,1%-0,3% Tr. X	0,1% Tr. X; 2% NGS 0,05 M Trisp., pH=7,5; 0,85% SMB	0,1% Tr. X; 2% NGS 0,05 M Trisp.; pH=7,5; 0,85% SMB	PBS; 0,1% Triton X
Verdünnung 1. Antik.	1:1000 - 1:3000	1:750 - 1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:750 - 1:1000
Verdünnungs- und Waschpuffer	PBS	PBS	PBS	0,05M Trisp.; pH=7,5; 0,85% NaCl	0,05 M Trisp.; pH=7,5; 0,85% NaCl	PBS
Nachweismethode	PAP und ABC	PAP und ABC	PAP	ABC	ABC	ABC und PAP

PF = Paraformaldehyd, GA = Glutaraldehyd, PP = Sörensen Phosphatpuffer, Cacop = Cacodylatpuffer,
 NGS = Normal Goat Serum, PBS = Phosphatpufferete NaCl-Lösung, SMB = Sodiunmetabisulfitt (NaS₂O₄)
 -KPBS = PBS mit erhöhter K-Konzentration

Dabei wurde jeweils das Verfahren angegeben welches die besten Ergebnisse lieferte. Da ein großer Teil der Ergebnisse der GABA Immuncytochemie mit dem Fixativ A erzielt wurde, das zeitlich aber später angewendete Fixativ B reproduzierbarere Ergebnisse lieferte wurden beide angeführt. Obwohl mit der ABC Methode meist etwas bessere Färbungen erzielt wurden als mit der PAP Methode, ist die PAP Methode im Falle ihrer Anwendung immer auch mitangeführt. Sämtliche verwendete Lösungen, mit der Ausnahme von PBS, KPBS und Tris Puffer, wurden vor Gebrauch frisch angesetzt.

2.4 Histochemie

2.4.1 Acetylcholinesterase

Der Nachweis von Acetylcholinesterase (AChE) erfolgte mit der von Karnovsky und Roots (1964) angegebenen Methode. Diese beruht auf der Freisetzung von Thiocholin mittels Hydrolyse von Acetylthiocholin (AthCh) durch AChE. Dieses Thiocholin reduziert Kaliumferricyanid zu Ferrocyanid und ergibt mit Cu^{2+} -Ionen den braunen Kupferferrocyanid-niederschlag. Da die AChE-Konzentration im Nervengewebe von Insekten 5 bis 50 mal höher als im Nervengewebe von Vertebraten ist (Boistel 1968), wurde die AthCh-Konzentration auf ein Zehntel der von Karnovsky und Roots angegebenen Konzentration herabgesetzt (3×10^{-4} M). Für die AChE-Histochemie wurden die Fliegenaugen, wie für die

GAD II Immunocytochemie angegeben, fixiert. Gefrierschnitte des Gewebes wurden dann für 2h im AthCh-Medium inkubiert. Das AthCh-Medium wurde folgendermaßen hergestellt:

- 2 mg AthCh werden in 26 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH=6,0 gelöst.

nacheinander werden unter gutem Mischen dann zugegeben

- 2 ml 0,1 M Natriumcitratlösung
- 4 ml 30 mM Kupfersulfatlösung
- 4 ml H₂O dest.
- 4 ml 5 mM Kaliumferricyanidlösung

Kontrollversuche wurden ohne AthCh im Inkubationsmedium durchgeführt. Die Hemmung der AChE durch Eserin wurde mit verschiedenen, dem AthCh-Medium an der Stelle von H₂O dest. beigefügten, Eserinkonzentrationen untersucht.

2.4.2 6-Hydroxydopamin

6-Hydroxydopamin (6-OHDA) soll wie Dopamin von dopaminergen Zellen aufgenommen werden und dann innerhalb der Zellen durch oxidative Prozesse H₂O₂ freisetzen (Sachs und Jonsson 1975).

3 µl einer 6-OHDA bromid Fliegenringer-Lösung (1mg/ml) wurden durch die Hinterhauptwand in ein Fliegenauge injiziert. Als Kontrolle dienten mit normalem Fliegenringer injizierte Augen. Die mit 6-OHDA behandelten Augen als auch die mit Ringer injizierten Kontrollaugen wurden im Zeitraum von einem Tag bis 3 Tage nach der Injektion dem immunocytochemischen Nachweis von Dopamin unterworfen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Cholinerge Zellen

3.1.1 Immuncytochemie

3.1.1.1 Übersicht

Zum Nachweis cholinerges Fasern wurde ein direkt gegen Acetylcholin (ACh) gerichteter, vom Hasen gewonnener Antikörper verwendet. Die Färbung der einzelnen optischen Loben in der Fleischfliege durch Anti-ACh war in unterschiedlichem Ausmaß reproduzierbar. Medulla, Lobula und Lobulaplatte wiesen große Variationen bezüglich der Anzahl der gefärbten Strukturen und der Intensität der Färbung auf. Die Färbungen in der Lamina variierten zwar in der Färbeintensität, konnten aber in allen Schnitten der Augen von 11 untersuchten Fliegen regelmäßig festgestellt werden. Dabei waren im allgemeinen quergeschnittene Fasern stärker gefärbt und somit besser zu erkennen als die nur selten gut gefärbten längsgeschnittenen Fasern. Anti-ACh färbte in Medulla, Lobula und Lobulaplatte meist sehr dünne Fasern (meist kleiner 1µm), wohingegen die reproduzierbare Färbung in der Lamina immer nur dickere Fasern (meist über 3µm) betraf. Diese Inkonsistenz der Färbung der dünnen Fasern einerseits und die ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der Anti-ACh Färbung dickerer Fasern andererseits deuten

darauf hin, daß die histologische Vorgehensweise mit einem Fehler behaftet ist der eine Zerstörung dünnerer cholinerg Fasern zur Folge hat. Änderungen im Ablauf der sehr empfindlichen ACh Immuncytochemie schwächten jedoch nur die erzielte Färbung. Zellkörperfärbungen konnten in den optischen Loben nicht beobachtet werden, wohl hingegen im ventrolateralen Protocerebrum. Hier wurden reproduzierbar einige, nicht näher identifizierte, Zellkörper mit Anti-ACh gefärbt.

Die Spezifität dieses ACh-Antikörpers wurde in vitro und durch Immuncytochemie in einem Insektengehirn nachgewiesen (Geffard et al. 1985). Die Präabsorption des ACh Antikörpers mit 10 μ M des Acetylcholin-Allylalkohol-Glutaraldehyd-Rinderserumalbumin(BSA) Konjugates unterband auch in *Calliphora erythrocephala* jegliche unspezifische neuronale Färbung (Abb.4).

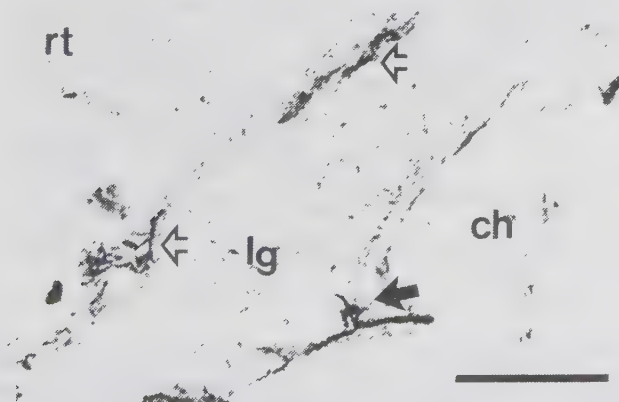


Abb.4 Ein Horizontalschnitt der mit Anti-ACh, nach Präabsorption mit 10 μ M des ACh-Allylalkohol-GA-BSA Konjugates, inkubiert wurde zeigt keine unspezifischen neuronalen Färbungen. Unspezifische nicht-neuronale Färbungen sind Tracheen (offene Pfeile) distal der Lamina (lg) und Luftsackmembranen (schwarzer Pfeil). Retina (rt); Chiasma (ch); Maßstab = 125 μ m

3.1.1.2 Photorezeptoren R1-R6

In der Abb. 5 A sind Fasern in der Lamina, die stark von Anti-ACh gefärbt sind, zu sehen. Diese Fasern ziehen von der Basalmembran durch die "fenestrated layer" und die

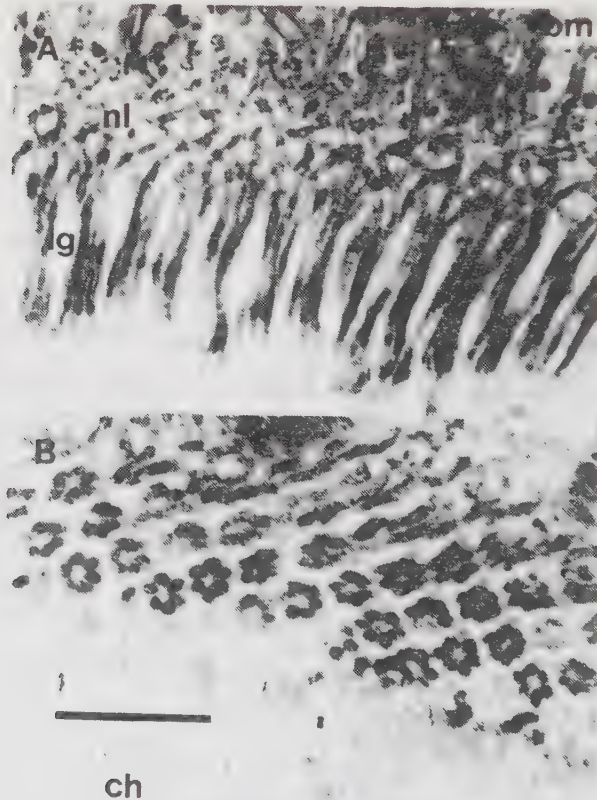


Abb.5 A: Frontalschnitt der die mit Anti-ACh gefärbten Endigungen der Photorezeptoren R1-R6 zeigt. Die Photorezeptoraxone ziehen von der Basalmembran (bm) zur proximalen Grenze der Lamina (lg), wobei ihre gegenseitigen Überkreuzungen in der "nuclear layer" (nl) deutlich zu erkennen sind.

B: Querschnitt durch die Cartridges der Lamina, der kontrastreich die mit Anti-ACh gefärbte "Krone" der 6 Photorezeptoren zeigt. Chiasma (ch); Maßstab = 50 μm

"nuclear layer" in die Lamina. In der "nuclear layer" ist ein starkes Überkreuzen der einzelnen Fasern sichtbar. Die Fasern verlaufen immer in Bündeln zusammengefaßt, parallel zueinander durch die Lamina und enden an deren proximaler Grenze. Schnitte, die senkrecht zur Längsachse dieser Fasern durch die Lamina gelegt sind, zeigen die Anordnung der Fasern zueinander deutlicher (Abb.5 B). Klar ist zu erkennen, daß jeweils 6 Fasern in einem Neuroommatidium kreisförmig um dessen zentrale Achse angeordnet sind. Der Faserverlauf sowie die Überkreuzung der einzelnen Fasern und ihre laminäre Anordnung erlauben eine eindeutige Identifikation der Fasern als Nervenendigungen der kurzen Photorezeptoren R1-R6 (Boschek 1971; Kirschfeld 1973). Eine Färbung der Photorezeptoren im distalen Bereich der Retina konnte nicht festgestellt werden. In einigen wenigen Fällen waren jedoch in einzelnen Ommatidien der proximalen Retina gefärbte Photorezeptoren R1-R6 zu beobachten.

3.1.2 Acetylcholinesterase Histochemie

Das Acetylcholin hydrolysierende Enzym Acetylcholinesterase (AChE) wurde in Insekten sowohl auf der präsynaptischen als auch auf der postsynaptischen Seite lokalisiert, wobei jedoch der postsynaptischen Seite eine größere AChE Aktivität zugeschrieben wird (Klemm 1976). AChE sollte jedoch in jedem Fall im Nervengewebe in den Bereichen nachgewiesen werden können, in denen

cholinerge Fasern enden. Die Abbildung 6 zeigt die Verteilung von AChE in der Lamina der Fliege. Die "nuclear layer" zeigt eine kräftige Färbung, die wahrscheinlich Monopolarzellkörper zuzuordnen ist. Proximal zu diesen gefärbten Zellkörpern sind einige Neuroommatidien senkrecht zu ihrer Längsachse geschnitten und zeigen eine AChE Färbung die Fasern zugeordnet werden muß. Dabei ist pro Cartridge nur in deren Achse eine Färbung sichtbar. Proximal dieser quer geschnittenen Cartridges sind in tangential geschnittenen Cartridges ebenfalls leicht mit AChE gefärbte Axone zu erkennen. Es ist anzunehmen, daß diese Färbungen dem laminären Teil der Monopolaren L1-L2 zuzuordnen sind.

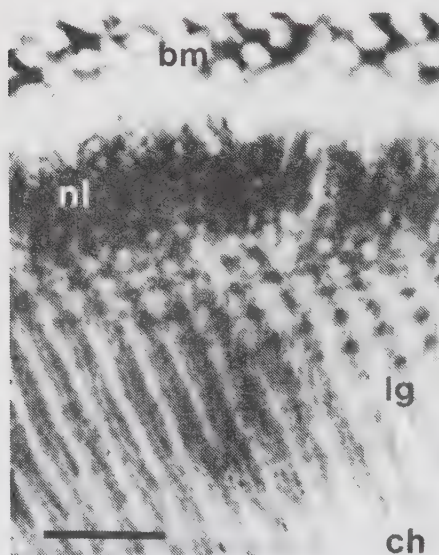


Abb.6 Ein tangential durch die Lamina (lg) geführter Schnitt zeigt die Verteilung der Acetylcholinesterase (AChE) Aktivität. In der "nuclear layer" (nl) sind die Monopolarzellkörper deutlich durch die AChE Histochemie markiert. Quergeschnittene Cartridges unterhalb dieser Zellkörper zeigen gefärbte Fasern in jeder Cartridge, die aufgrund ihrer Lage als Axone der Monopolarzellen L1-L2 zu identifizieren sind. Basalmembran (bm) Chiasma (ch); Maßstab = 50 µm

Kontrollfärbungen mit Inkubationen ohne Acetylthiocholin (AthCh) zeigten keine Färbungen.

Um die Spezifität der erhaltenen Färbung abzusichern

wurde die Färbung von AChE in Anwesenheit von Eserin (einem Hemmstoff der Acetylcholinesterase) durchgeführt. Abbildung 7 stellt die Färbung der optischen Loben mit der AChE Histochemie ohne und mit Eserin gegenüber. Ohne Hemmung der AChE zeigen die Lamina, die Medulla und die Lobula AChE Aktivität (Abb.7 A). Eserin in Konzentrationen herab bis zu 10^{-5} M unterdrückte jegliche AChE Aktivität (Abb.7 B). Erst bei Eserinkonzentrationen, die gleich oder kleiner als 10^{-6} M waren, wurde die AChE Färbung nicht beeinträchtigt.

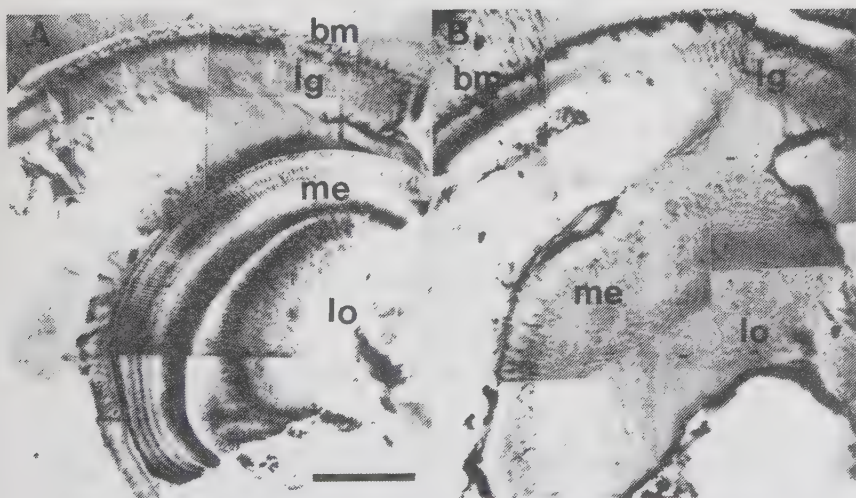


Abb.7 A: Verteilung der Acetylcholinesterase (AChE) Aktivität in den optischen Loben von *Calliphora*. Färbungen sind in der Lobula (lo), der Medulla (me) und in der "nuclear layer" (weiße Pfeile) distal der Lamina ganglionaris (lg) sichtbar. Die Basalmembran (bm) zeigt eine unspezifische Färbung.

B: Die Inkubation mit der Anticholinesterase Eserin (10^{-4} M) hemmt die AChE Aktivität in den optischen Loben der Fleischfliege vollständig. Maßstab = 250 μ m

3.1.3 Allgemeine Vorbemerkungen zur Elektrophysiologie

3.1.3.1 Verschaltung und lichtinduzierte Antworten von Photorezeptoren R1-R6 und Monopolaren L1-L2

Die Verschaltung der Photorezeptoren R1-R6 auf die postsynaptischen Monopolaren L1-L2, deren intrazellulär abgeleitete Potentiale, sowie die verschiedenen Ableitorte zeigt Abbildung 8. Intrazelluläre Ableitungen von Photorezeptoren R1-R6 aus dem Laminabereich zeigten graduierte depolarisierende Potentiale als Antwort auf Reizung mit unbuntem Licht verschiedener Intensitäten. Die Ableitungen von Monopolaren erfolgten meist im distalen Bereich des Chiasma, seltener in der Lamina. Der hyperpolarisierenden graduierten On-Antwort der Monopolaren folgt eine Plateauphase. Auf Licht-Aus reagiert die Monopolare mit einer depolarisierenden Off-Antwort.

3.1.3.2 Intrazelluläre Ableitungen mit Superfusion

Die Antwort der Monopolaren behielten auch in der Ringerbadlösung ihr typisches Erscheinungsbild. Ableitungen von Monopolaren die eine geringere und langsamere Off-Antwort aufwiesen waren jedoch hier häufiger als bei Ableitungen ohne Bad. Die maximalen On-Amplituden variierten von -15 mV bis -45 mV.

Die Untersuchung der Wirkungen badapplizierter Pharmaka

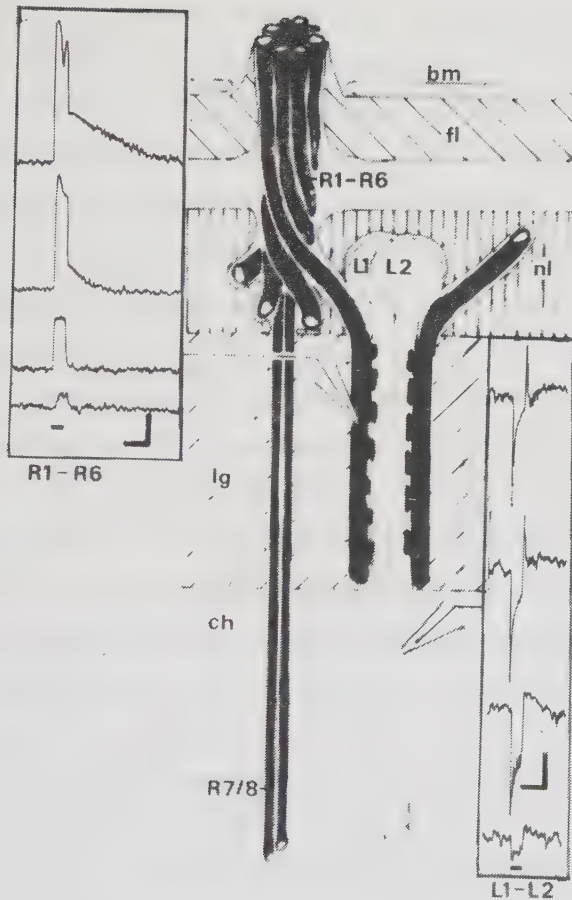


Abb.8 Verschaltung der Photorezeptoren auf die Monopolaren und deren intrazellulär abgeleitete lichtinduzierte Potentiale

Die Photorezeptoren R1-R6 ziehen durch die Basalmembran (bm) und die "fenestrated layer" (fl) und überkreuzen sich dann in der "nuclear layer" (nl). Sie sind in der Lamina ganglionaris (lg) präsynaptisch zu den Monopolarzellen L1-L2. Die langen Photorezeptoren R7/8 ziehen, ohne sich zu überkreuzen und ohne synaptischen Kontakt in der Lamina durch diese und das Chiasma (ch) hindurch und enden erst im 2. optischen Ganglion, der Medulla.

Eine Übersicht der intrazellulär abgeleiteten Potentiale von Photorezeptoren R1-R6 und von Monopolaren L1-L2 geben Inset R1-R6 und Inset L1-L2. Inset R1-R6 zeigt die graduierten Depolarisationen eines Photorezeptors bei den relativen Lichtintensitäten von $\log I = 0; -1,5; -3; -4,5$; (von oben nach unten). Inset L1-L2 zeigt die hyperpolarisierenden Antworten einer Monopolarzelle L1-L2 bei den gleichen Lichtintensitäten wie des Inset R1-R6.

Kalibrierung: Inset R1-R6 20 mV, 200 ms; Inset L1-L2 10 mV, 200 ms

auf die Antwort von monopolaren Zellen L1-L2 mittels intrazellulärer Ableitungen brachte methodische Probleme mit sich. Die Superfusion verringerte sowohl die Anzahl erfolgreicher Monopolarableitungen als auch deren Ableitzeit. Der Lösungswechsel stellte zudem eine mechanische Störung dar, die häufig zum frühzeitigen Verlust der angestochenen Zelle führte. Um aber alle Wirkungen des applizierten Pharmakons zu beobachten und durch Waschen mit Ringer wieder aufzuheben, sollte die intrazelluläre Ableitung der angestochenen Zelle so lange wie möglich aufrecht erhalten werden. Meistens betrug die Ableitzeit jedoch nur etwa 20 min. So war es nur in 2 Fällen möglich die Wirkung eines Pharmakons durch Auswaschen mit Ringer aufzuheben und somit die ursprüngliche Antwort wieder zu erhalten. In beiden Fällen betrug die Ableitzeit über eine Stunde. Im Falle einer 45 minütigen Photorezeptorableitung war nur eine teilweise Erholung der Antwort zu beobachten. Aufgrund der relativ kurzen Ableitdauer von 20 min wurden die verwendeten Pharmaka in relativ hohen Dosen aufgebracht. Um beobachtete Wirkungen eines Pharmakons abzusichern wurden weitere Monopolarableitungen unter Superfusion desselben Pharmakons in gleicher Konzentration durchgeführt. Eine spezifische Wirkung eines Pharmakons wurde dann angenommen wenn sowohl die Wirkung als auch der zeitliche Verlauf in mehreren Versuchen reproduzierbar war. Ableitungen von Photorezeptoren unter Superfusion von Pharmaka mit erwiesener postsynaptischer Wirkung dienten zur

Kontrolle. Die Unwirksamkeit eines Pharmakons galt als erwiesen wenn mehrere Versuche keine Auswirkung auf die abgeleiteten Potentiale zeigte. Als weitere Möglichkeit die Unwirksamkeit eines Pharmakons festzustellen diente folgende Vorgehensweise: Nach mindestens 20 minütiger Superfusion eines Pharmakons ohne Auswirkung auf das abgeleitete Potential wurde diese Lösung gegen eine bereits als wirksam erwiesene Pharmakonlösung ausgetauscht. Beim Auftreten pharmakaspezifischer Wirkungen wurde dann das zuerst applizierte Pharmakon als unwirksam angesehen, wenn sowohl Unwirksamkeit als auch Wirkung in der Ableitung von ein und derselben Zelle sichtbar war.

3.1.4 Intrazelluläre Ableitungen mit pharmakologischer Beeinflussung der cholinergen Transmission

3.1.4.1 Auswahl der Pharmaka

Da bei der Applikation von Agonisten oft Schwierigkeiten bei der Ergebnisinterpretation auftreten können (siehe Material und Methoden S.10), wurde als einziger Agonist der Transmitterkandidat Acetylcholin appliziert.

Da durch Bindungsstudien mit Nervengewebe von Dipterenköpfen 3 verschiedene ACh Rezeptoren mit unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften beschrieben worden sind (Harrow et al. 1982; Sattelle 1980) erfolgte die Wahl der verwendeten ACh Antagonisten nach 2 Kriterien. Die Pharmaka sollten nicht nur bekannt für ihre potente

antagonistische Wirkung sein, sondern durch ihre spezifischen pharmakologischen Eigenschaften eine approximative Bestimmung des ACh Rezeptortyps der Monopolaren L1-L2 ermöglichen.

3.1.4.2 Acetylcholin (ACh)

Die Abbildung 9 zeigt den zeitlichen Verlauf der Änderungen einer Monopolarenantwort unter badappliziertem Acetylcholin (10^{-3} M). Das Ruhepotential wurde 4 min nach Acetylcholinzugabe leicht in negative Richtung verschoben. Dieser Abfall des Ruhepotentials war gleichzeitig mit einer Abnahme der Amplitude der On-Antwort verbunden. 5 min nach der ACh Applikation war das Ruhepotential um insgesamt 7,5 mV gefallen. Die Amplitude der On-Antwort verringerte sich ebenfalls um 7,5 mV. Die Off-Antwort war verschwunden und die Zelle erreichte nun erst 100 ms nach Licht-Aus das Ruhepotential. Die Plateauphase flachte sich in ihrem zeitlichen Verlauf ab. Das Plateau war dabei zum Zeitpunkt von Licht-Aus ebenfalls, wie das Ruhepotential, um 7,5 mV in negativer Richtung verschoben. 7 min nach ACh Zugabe zeigte das Ruhepotential eine negative Verschiebung von 12,5 mV gegenüber dem Ruhepotentialwert vor der Zugabe von ACh. Auch jetzt hatte die Reduktion der On-Antwort um 12,5 mV die Größe der Ruhepotentialverschiebung. Eine Off-Antwort wurde nicht beobachtet. Die Plateauphase war nicht weiter in negativer Richtung verschoben worden und war noch

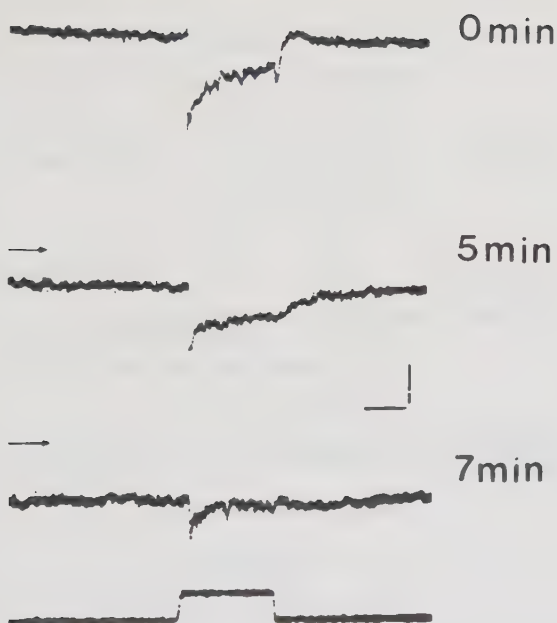


Abb.9 Veränderungen der lichtinduzierten Monopolarenantwort durch die Superfusion von Acetylcholin (10^{-9} M). Das Ruhepotential wurde in negativer Richtung verschoben. Die Pfeile zeigen das Niveau des Ruhepotentials vor ACh (0 min). Die Amplitude der On-Antwort verkleinert sich mit zunehmender Ruhepotentialverschiebung. Die Länge des Lichtreizes ist in der untersten Spur angegeben. Log I = -1,5; Kalibrierung: 10 mV, 50 ms

immer auf dem gleichen Niveau wie 5 min nach ACh.

Diese dargestellten Änderungen der Lichtantwort waren typisch für alle 3 im ACh-Bad (10^{-9} M) untersuchten Monopolarzellen.

Intrazelluläre Ableitungen der Photorezeptorantworten in 10^{-9} M ACh zeigten keine Veränderungen.

3.1.4.3 Eserin

Eserin hemmt die Hydrolyse von ACh durch Bindung an die esterbindende Untereinheit des aktiven Zentrums der Acetylcholinesterase (Eldefrawi 1985). Die Antworten einer Monopolarzelle zu verschiedenen Zeiten nach der Applikation von Eserin (10^{-3} M) sind in Abbildung 10 zu sehen. Von dieser Zelle konnte über eine Stunde abgeleitet werden. Dadurch war es möglich die Aufhebung des Eserineffektes durch nachfolgendes Waschen in Ringer zu zeigen. 6 min nach Eserinzugabe waren erste Wirkungen der Anticholinesterase feststellbar. Das Ruhepotential zeigte nur eine kleine Verschiebung um 2,5 mV in negativer Richtung. Die Amplitude der On-Antwort war 4 mV kleiner geworden, was einer Reduktion auf 85% des ursprünglichen Wertes entsprach. 11 min nach Eserin ist die On-Antwort bereits um insgesamt 10 mV verkleinert bzw auf 55% der Amplitudenhöhe vor Eserin abgefallen. Ein weiteres negatives Abfallen des Ruhepotentials war nicht zu beobachten. 8 min nach Eserinzugabe wurde bei der monopolaren Zelle der Abbildung 10 eine Superfusion mit Ringerlösung begonnen. 20 min nach der Applikation von Ringer begann die On-Antwort langsam wieder größer zu werden. Die ursprüngliche Amplitude der On-Antwort war erst nach 45 minütigem Bad in der Ringerlösung wieder hergestellt.

2 weitere L1-L2 Zellen wurden ebenfalls im Eserinbad abgeleitet (10^{-3} M und 10^{-2} M). Bei beiden Zellen wurde

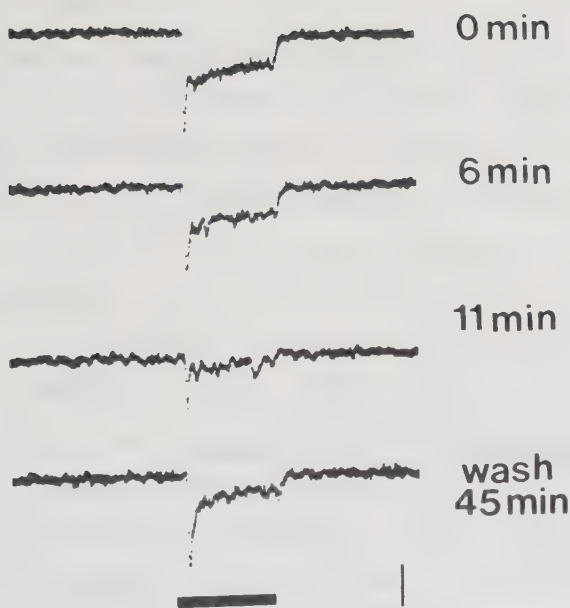


Abb.10 Veränderungen und Reversibilität der Wirkungen von badappliziertem Eserin auf die Monopolarenantwort. Nach 11 minütiger Superfusion mit Eserin (10^{-3} M) ist die Amplitude der On-Antwort auf die Hälfte des Wertes vor Eserinzugabe gesunken. Nach 45 minütigem Waschen in Fliegenringer ist die ursprüngliche Antwortform wieder hergestellt. Die Länge des Lichtreizes ist in dieser, wie auch in allen weiteren Darstellungen unterhalb der Lichtantworten durch einen Balken angegeben. Log I = -4,5; Kalibrierung: 10 mV, 50 ms

die Eserinsuperfusion nicht frühzeitig durch das Einwechseln von Ringer unterbrochen. Im länger andauernden Eserinbad wurde die On-Antwort bei beiden Zellen weiter verkleinert. Die Amplitude der On-Antwort wurde dabei, im Fall der mit 10^{-2} M Eserin inkubierten Zelle, 9 min nach Applikation auf 15% des Originalwertes reduziert.

Ableitungen aus Photorezeptoren in Eserinlösung zeigten jedoch auch eine Reduzierung der Amplitude der graduierten depolarisierenden Lichtantwort. Abbildung 11 belegt diese Abnahme wie auch die teilweise Wiederherstellung der Photorezeptorenantwort nach 25 minütigem Waschen in Ringerlösung.

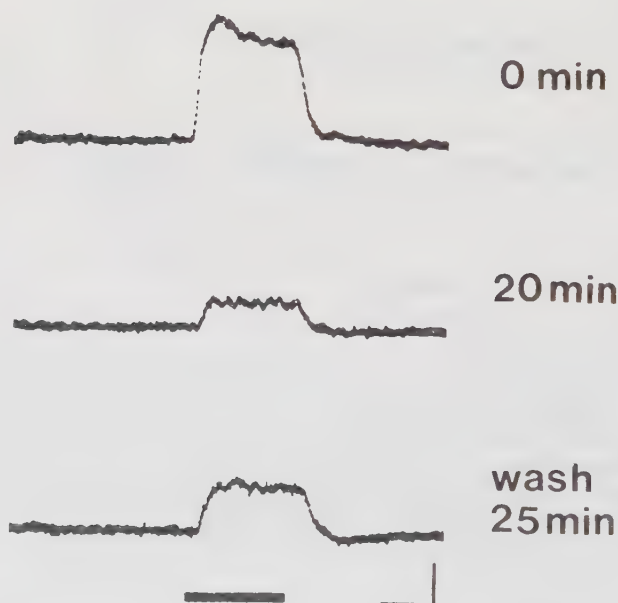
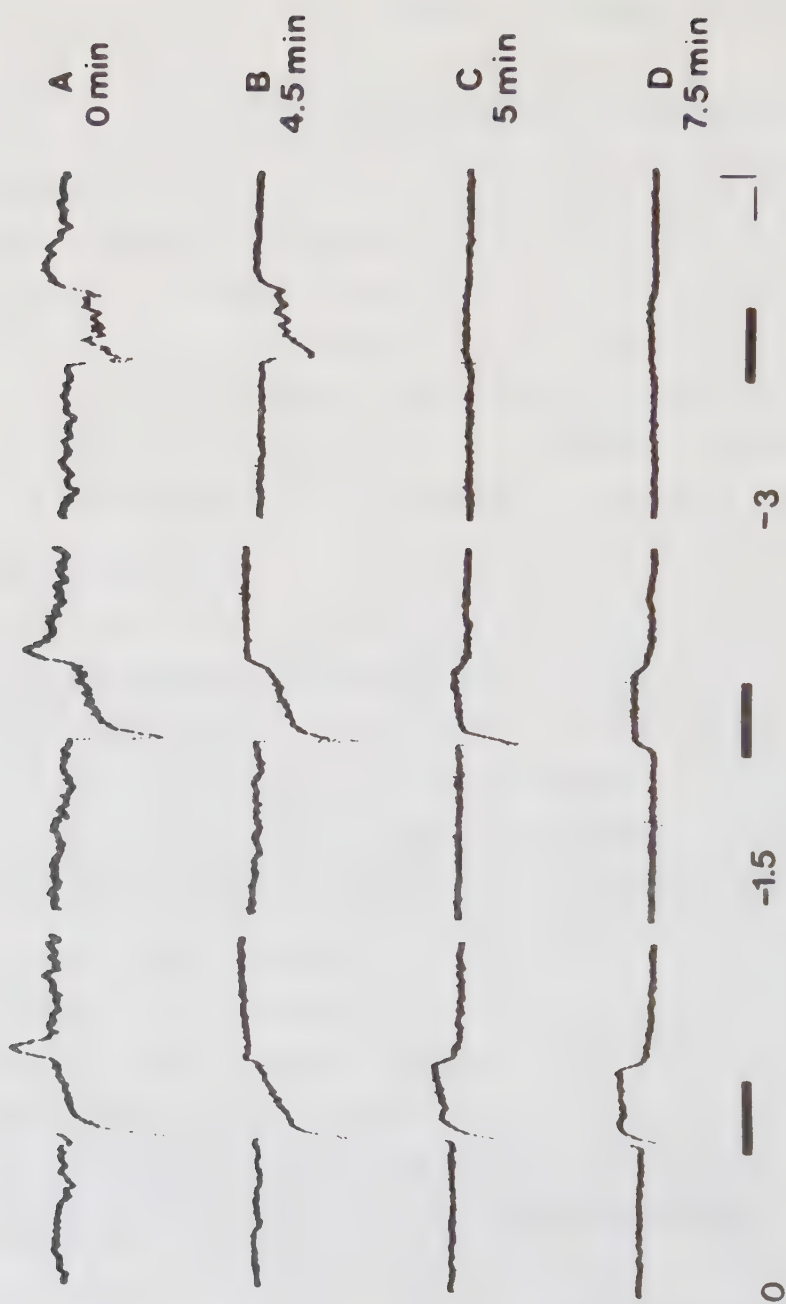


Abb.11 Veränderungen und Aufhebung der Eserinwirkungen auf die Antwort der Photorezeptoren R1-R6. 20 min nach Eserinzugabe ist die Amplitude der depolarisierenden Lichtantwort der Photorezeptoren stark verkleinert. 25 minütiges Waschen in Ringerlösung vergrößert die Amplitude der Photorezeptorenantwort wieder. Log I = -1,5; Kalibrierung: 10 mV, 50 ms

3.1.4.4 Decamethonium (DECA)

Decamethonium zeigte in Bindungsstudien von Extrakten aus dem Kopf der Stubenfliege *Musca domestica* eine hohe Affinität zu einem putativen cholinergen Rezeptor (Donnellan et al. 1975; Mansour et al. 1977). Durch Versuche, in denen verschiedene Pharmaka in Fliegen injiziert wurden, konnte Dudai (1980) zeigen, daß DECA, und in geringerem Ausmaß auch Hexamethonium, die einzigen Pharmaka waren, die auch in geringer Konzentration bei den behandelten Fliegen reproduzierbare spezifische Verhaltenseffekte hervorriefen.

Die lichtinduzierten Antworten der Monopolarzellen konnten durch DECA geblockt werden. Die Abbildung 12 zeigt die Veränderungen der Monopolarantworten bei unterschiedlichen Reizintensitäten zu verschiedenen Zeiten nach der DECA Applikation (10^{-3} M). 4,5 min nach DECA Zugabe hatte sich die Amplitude der On-Antwort nur sehr wenig verändert. Die Off-Antwort der Zelle war dahingegen ganz verschwunden (Abb.12, Reihe B). Gleichzeitig war das Rauschen der Zelle stark vermindert worden. Nur eine halbe Minute später (5 min nach DECA) war die On-Antwort eliminiert oder annähernd auf die Hälfte reduziert worden ($\log I = 0$); gleichzeitig wurde die Plateauphase bei den beiden höheren Intensitäten über das Ruhepotential hinaus positiv verschoben (Abb.12, Reihe C). 7,5 min nach DECA reagiert die Zelle nur noch bei der höchsten Intensität auf den Lichtreiz mit einer kleinen



hyperpolarisierenden On-Antwort, der dann die mittlere depolarisierende Plateauphase folgt (Abb.12, Reihe D). Die Antwort bei kleinen Lichtintensitäten ($\text{Log } I = -3$, $\text{Log } I = -1,5$) zeigt keine hyperpolarisierende On-Antwort mehr. Die Antwort ähnelt nun vielmehr einer Photorezeptorenantwort bei geringer Reizintensität. Das Ruhepotential zeigte eine kleine Verschiebung von -3 mV .

Die beschriebenen Wirkungen von DECA konnten bei 5 anderen Monopolarzellaufzeichnungen in DECA (10^{-2} M , 10^{-3} M , 10^{-4} M) in vergleichbarer Weise beobachtet werden. Dabei waren im Fall der Ableitung in 10^{-2} M DECA die ersten Wirkungen bereits nach 2 min sichtbar und eine Blockierung der Monopolarenantwort erfolgte 3 min nach DECA. Bei der Applikation von DECA in geringerer Konzentration traten die ersten Wirkungen 4 min bis 7 min nach DECA auf. Eine maximale Wirkung zeigte sich im Zeitraum von 6 min bis 10 min nach der DECA Zugabe. Da alle unter DECA-Einfluss abgeleiteten Zellen während bzw. nach dem Einwechseln der normalen Ringerlösung verloren wurden konnte eine Reversion der DECA-Effekte nicht gezeigt werden.

⇒

Abb.12 Veränderungen der Monopolarenantwort bei verschiedenen Lichtintensitäten und zu unterschiedlichen Zeiten nach der Zugabe von Decamethonium (DECA, 10^{-3} M). 4,5 min nach DECA ist die Off-Antwort verschwunden. Gleichzeitig ist das Rauschen der Zelle stark vermindert. 5 min nach DECA ist die On-Antwort kleiner geworden oder sogar verschwunden ($\text{Log } I = -3$). Nach 7,5 min ist nur noch bei der höchsten Lichtintensität ($\text{Log } I = 0$) eine kleine On-Antwort zu beobachten. Links der die Lichtdauer anzeigenden Balken ist der Logarithmus der Lichtintensität angegeben. Kalibrierung: 10 mV, 50 ms

Um die DECA-Wirkungen möglicherweise schneller wieder aufheben zu können und Wirkungen auch bei geringerer Konzentration nachzuweisen wurden auch DECA Applikationen mit Konzentrationen von 10^{-5} M und 10^{-6} M durchgeführt. In 10^{-5} M DECA konnte keine stabile Monopolarenableitung erhalten werden. In 10^{-6} M DECA war bei einer Monopolarenableitung 13 min nach DECA eine 50% Verminderung der On-Antwort sichtbar. Die kleine Off-Antwort dieser Zelle war ganz verschwunden. Kurze Zeit später wurde diese Zelle jedoch verloren. Die intrazellulär abgeleiteten Antworten der Photorezeptoren zeigten während der Superfusion mit DECA keine Veränderungen.

3.1.4.5 Curare

Curare (*d*-tubocurarin) ist als effektiver Antagonist am nicotinischen cholinergen Rezeptor der Vertebraten bekannt (Prives 1980). Auch im Nervengewebe von Insekten zeigte sich Curare als potenter Antagonist der α -Bungarotoxinsensitiven nicotinergeren ACh Rezeptoren erwiesen (Sattelle 1985).

Die Monopolarenantwort konnte durch Curare geblockt werden. Diese Blockierung und die Reversion der Curarewirkung (10^{-3} M) sind in Abbildung 13 zu sehen. Die Antwort dieser Zelle war 6 min nach der Curareapplikation total verschwunden. Dabei wurde das Ruhepotential um 5 mV in positiver Richtung verschoben. Die Wiederherstellung

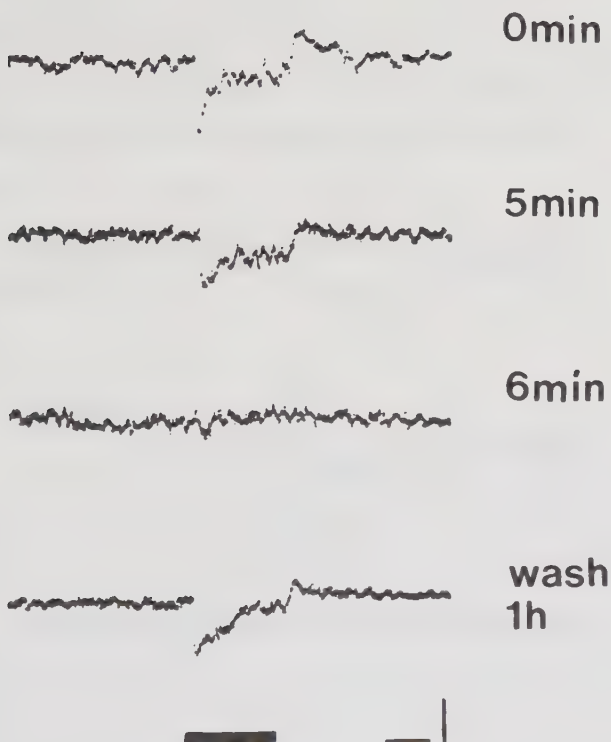


Abb.13 Durch Curare hervorgerufene Veränderungen in der Antwort von Monopolaren und deren Aufhebung. 5 min nach Superfusion mit 10^{-3} M d-Tubocurarin (Curare) stellt sich die Antwort der Monopolare bereits verkleinert dar. 6 minütige Superfusion blockiert die Antwort zur Gänze. Ein einstündiges Waschen in Ringerlösung hob die Curarewirkungen wieder auf. Log I = -1,5; Kalibrierung: 10 mV, 50 ms

der ursprünglichen Antwort war erst nach einstündigem Waschen in Ringerlösung zu beobachten. Ein weiterer Effekt von Curare, nämlich die Reduzierung des Rauschens, ist aufgrund des hohen Eigenrauschens der im Experiment der Abbildung 13 verwendeten Elektrode nur undeutlich zu

erkennen. Abbildung 14 zeigt Antworten einer weiteren Monopolare in Curare (10^{-3} M). Außer der Blockierung der Antwort ist hier aber auch noch deutlich die Verminderung des Zellrauschens sichtbar. Das Ruhepotential dieser Zelle stieg während der Curareapplikation um 6 mV an.

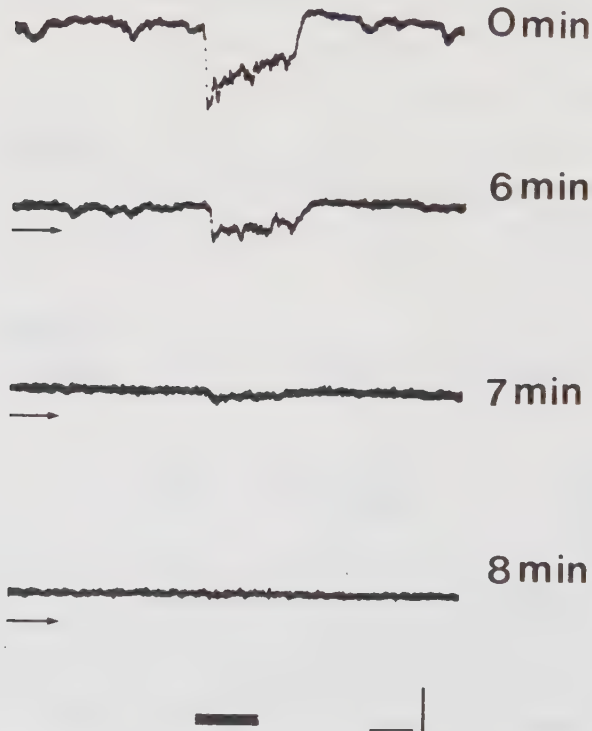


Abb.14 Die gleichen Veränderungen der Monopolarenantwort durch bad-appliziertes Curare (10^{-3} M) wie die der Abbildung 13 sind auch hier zu beobachten. Eine Abnahme des Rauschens der Zelle ist schon 6 min nach Curare festzustellen. 7 min nach Curare ist das Rauschen vollkommen verschwunden. Die Pfeile verweisen auf das Niveau des Ruhepotentials vor der Curarezugabe. Log I = -5,5
Kalibrierung: 10 mV, 50 ms

3 weitere in Curare (zwei in 10^{-3} M eine in 10^{-4} M Lösung) abgeleitete Monopolare zeigten alle ähnliche Effekte: das Ansteigen des Ruhepotentials um 5 mV bis 6 mV; die Reduktion der On- und der Off-Antwort innerhalb von 4 min bis 6 min nach Curare und die totale Blockierung der Antwort innerhalb von 8 min nach Curare. Die Antwort der Photorezeptoren wurde von Curare nicht beeinflusst.

3.1.4.6 α -Bungarotoxin (α -BGTX)

α -BGTX ist sogar in nanomolaren Konzentrationen als potenter irreversibler Antagonist vieler nicotinerger ACh Rezeptoren in Vertebraten bekannt (Schmidt et al. 1979). Mögliche nicotinerge ACh Rezeptoren wurden durch Bindungsstudien sowohl im Nervengewebe aus Köpfen der Fruchtfliege (Dudai 1980; Rudloff et al. 1980) als auch aus Köpfen der Stubenfliege entdeckt (Eldefrawi und Eldefrawi 1980; Jones et al. 1981).

Eine 30 minütige Superfusion in α -BGTX ($1,6 \times 10^{-6}$ M) zeigte jedoch keine Auswirkung auf die intrazellulären Potentiale einer Monopolaren (Abb. 15). Selbst nach einer einstündigen Applikation von α -BGTX konnten bei einer anderen Zelle unveränderte Monopolarantworten abgeleitet werden. Bei einer weiteren Monopolaren, die während eines 25 minütigen Bades in α -BGTX ($1,6 \times 10^{-6}$ M) keine Veränderungen ihrer Antworten zeigte, führte der anschließende Ersatz der α -BGTX Lösung durch eine 10^{-3} M

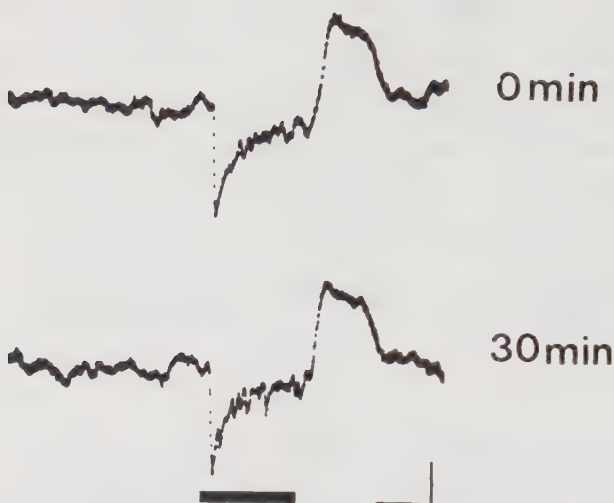


Abb.15 Auch nach 30 minütiger Applikation von α -Bungarotoxin (BGTX; $1,6 \times 10^{-8}$ M) zeigt sich keine Veränderung in der Antwort der Monopolaren. Log I = -1,5; Kalibrierung: 10 mV, 50 ms

DECA-Lösung dann jedoch zu den typischen Veränderungen der Monopolarenantwort durch DECA. α -BGTX scheint demzufolge keinen Einfluss auf den möglicherweise cholinergen Rezeptor der Monopolaren L1-L2 zu besitzen.

3.1.4.7 Atropin, Hexamethonium, Hemicholinum 3

Strychnin

In *Drosophila melanogaster* bindet Atropin in geringer Konzentration an einen möglichen muscarinergen ACh Rezeptor (Dudai und Ben-Barak 1977). Drei Monopolarzellen wurden in Atropin (10^{-3} M) abgeleitet. Dabei konnte bei einer Zelle eine leichte Abnahme der On-Amplitude beobachtet werden. Die beiden anderen Ableitungen zeigten

Jedoch keinen Effekt. Eine Wirkung von Atropin auf den putativen ACh Rezeptor der Monopolaren scheint aufgrund dieser Befunde nicht vorzuliegen.

Eine Ableitung unter Hexamethonium (10^{-3} M) zeitigte die gleichen Veränderungen der Monopolarenantwort wie sie auch von DECA verursacht wurden.

Die Badapplizierung von Hemicholinum 3 (HC-3), ein Hemmstoff der präsynaptischen Cholinaufnahme (Breer 1981), in einer Konzentration von 10^{-3} M verursachte in einem Experiment eine Abnahme der On-Amplitude. 8 min nach HC-3 war ihr Wert auf 70% des ursprünglichen Wertes abgefallen. Nach weiteren 4 min (12 min nach HC-3) war die On-Antwort auf ein Drittel des Wertes vor HC-3 vermindert. Das Ruhepotential zeigte eine Zunahme um 2,5 mV.

Kehoe (1972) konnte in *Aplysia* 3 verschiedene ACh Rezeptortypen, darunter einen strychninsensitiven Typ, zeigen. Die Ableitung einer Monopolaren in 10^{-2} M Strychnin zeigte jedoch auch nach über 15 min keine Veränderungen. Der sich daran anschließende Wechsel des Bades durch eine DECA Lösung (10^{-3} M) zeitigte dahingegen die typischen DECA Wirkungen.

3.2 GABAerge Zellen

3.2.1 Immuncytochemie von γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glutamatdecarboxylase (GAD)

3.2.1.1 Übersicht

Zum immuncytochemischen Nachweis GABAerger Zellen in *Calliphora* wurden 2 verschiedene Antikörper gegen GAD und ein direkt gegen GABA gerichteter Antikörper verwendet. Wie schon in Material und Methoden erwähnt, wurden für die GABA Immuncytochemie 2 verschiedene Fixative verwendet. Zellen die, bei Verwendung von Fixativ A, nur bei Dunkeladaptation des Fliegenauges mit Inkubation in GABA (100 μ M) und gleichzeitiger Blockierung des GABA Abbaues durch Gabaculin (100 μ M) (Rando und Bangerter 1977; Löscher 1980) angefärbt wurden, ein Vorgehen das andererseits eine schlechtere Anfärbung anderer GABAerger Zellpopulationen bedingte (Datum et al. 1986), konnten mit dem Fixativ B ohne Vorbehandlung des Auges reproduzierbar angefärbt werden. Zudem wurde durch die Einfügung des NaBH_4 -Schrittes die Reaktion freier Aldehydgruppen des Gewebes mit DAB unterdrückt, und somit die unspezifischen nicht-neuronalen Färbungen verringert.

Schnitte des gleichen Auges, die zudem auf dem gleichen Objekträger aufgebracht waren, wiesen oft große Variationen bezüglich ihrer Backgroundfärbung als auch der Intensität der Färbung auf. Die Anwendung von Fixativ B

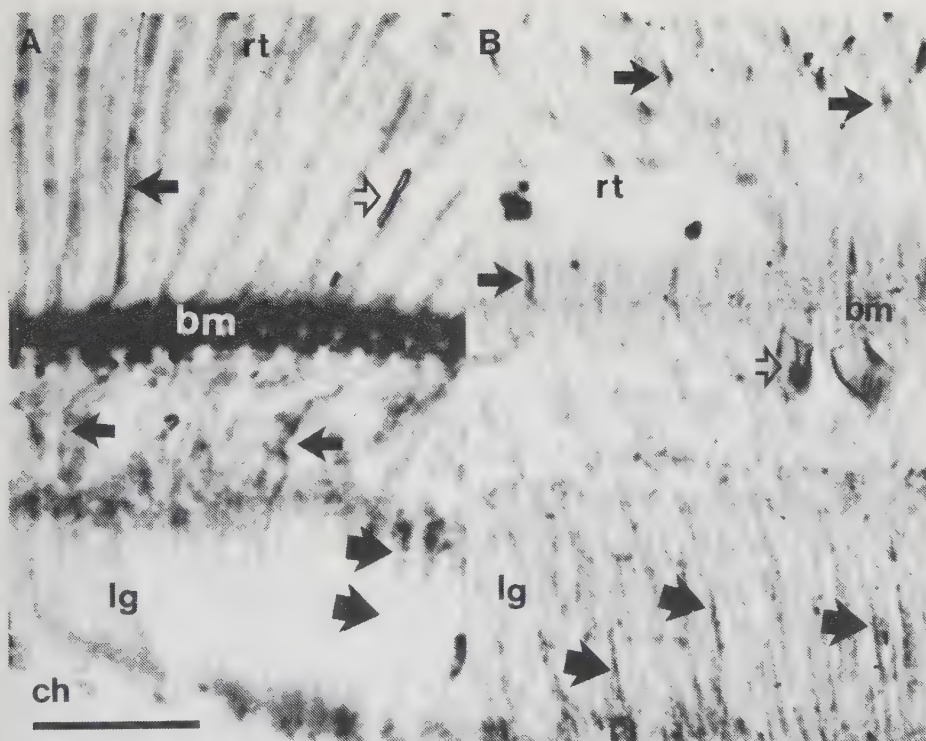


Abb.16 Gefrierschnitte von 20 μm Dicke zeigen Teile der Retina (rt), der Lamina ganglionaris (lg) und des 1. optischen Chiasmas (ch). Die gezeigten Schnitte wurden beide mit Anti-Gaba inkubiert und mit der PAP-Methode weiter immunocytochemisch behandelt. Die Unterschiede in der Färbung von neuronalen und nicht-neuronalen Strukturen in A und B ist durch die Anwendung zweier unterschiedlicher Fixiermethoden bedingt (siehe Tabelle). Die Färbung der Basalmembran (bm) in A ist in B, durch die Absättigung freier Aldehydgruppen durch Natriumborhydrid, gänzlich unterbunden. Die unspezifische Färbung der Tracheen (offene Pfeile) bleibt dahingegen bestehen.

A: 2 verschiedene Fasersysteme sind immunocytochemisch angefärbt. Kleine schwarze Pfeile weisen auf Fasern hin die aus der Retina durch die Basalmembran in die Lamina ziehen. Die großen schwarzen Pfeile weisen auf eine gefärbte Faser die aus dem Chiasma kommend in die Lamina zieht und an deren distaler Grenze endet. Mehrere solcher gefärbter Fasern sind in der Lamina zu sehen.

B: Durch Verwendung des Fixativs B konnten sowohl die Fasern die der Retina entspringen (kleine schwarze Pfeile), die in diesem Schnitt tangential angeschnitten sind, als auch die Fasern die aus dem Chiasma kommend in die Lamina ziehen (große schwarze Pfeile) gleichmäßiger angefärbt werden. Maßstab = 50 μm

konnte zwar diese Variationen mindern, jedoch nicht gänzlich beseitigen. Die 3 verschiedenen Antikörper (GABA, GAD I, GAD II) zeigten geringfügige Unterschiede hinsichtlich der Anzahl als auch der Art der gefärbten neuronalen und nicht-neuronalen Strukturen. Andererseits färbten alle 3 Antikörper die gleichen, morphologisch definierten Zellen.

2 verschiedene GABAerge Zellpopulationen konnten dabei unterschieden werden:

1. Axone, die aus der Retina kommend durch die Basalmembran und die Lamina ganglionaris in das erste optische Chiasma ziehen (Abb.18) und
2. Axone, die von der Medulla kommend durch das Chiasma in die Lamina ziehen und an deren distaler Grenze enden (Abb.23,24).

Eine Übersicht über GABAerge Strukturen in Retina und Lamina von *Calliphora erythrocephala* und gleichzeitig ein Vergleich der beiden Fixative geben Abbildung 16A und 16B.

3.2.1.2 Kontrollexperimente

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt um spezifische neuronale Färbungen von unspezifischen Färbungen neuronaler als auch nicht-neuronaler Elemente zu unterscheiden. Die Durchführung der Immuncytochemie ohne primären Antikörper zeigte Färbungen der Luftsackmembranen, der Tracheen, der Basalmembran und in geringerem, stark variierendem Maße auch der

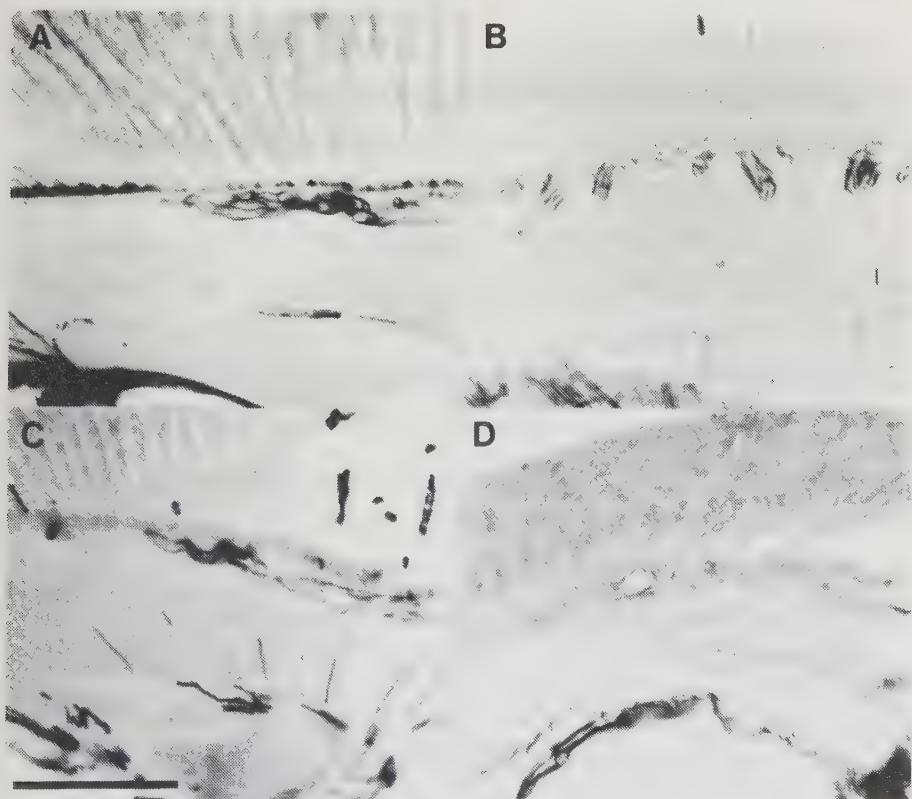


Abb.17 Kontrollfärbungen

A: Ein mit der ABC-Methode immuncytochemisch gefärbter Horizontalschnitt, der ohne primären Antikörper inkubiert wurde. Die Luftsackmembranen, die Tracheen und die Basalmembran weisen eine unspezifische Färbung auf. Eine unspezifische Färbung von Pigmentzellen ist ebenfalls zu erkennen.

B: Ein mit NaBH_4 behandelter Schnitt, der mit Anti-GABA, nach Präabsorption des primären Antikörpers mit $10 \mu\text{M}$ des GABA-GA-BSA-Konjugates, inkubiert wurde, zeigt keine unspezifische neuronale Färbung. Der NaBH_4 -Schritt unterdrückt zudem die unspezifische Färbung von Basalmembran und Pigmentzellen. Tracheen und Luftsackmembranen sind auch hier unspezifisch gefärbt.

C: Ein Schnitt, der mit Anti-GAD II nach Präabsorption mit $300 \mu\text{M}$ GAD inkubiert wurde, läßt keine unspezifische neuronale Färbung erkennen.

D: Ein mit Anti-GAD I inkubierter Schnitt, nach Präabsorption mit $300 \mu\text{M}$ GAD, zeigt einige unspezifisch gefärbte Monopolarzellkörper. Maßstab = $125 \mu\text{m}$

Pigmentzellen der Retina (Abb. 17A). Die Färbungen der Luftsackmembranen und der Tracheen wurden wahrscheinlich von endogenen Peroxidasen verursacht, da sie auch, bei Umgehung der Antikörperreaktionen jedoch unter Beibehaltung des NaBH_4 -Schrittes, bei alleiniger Durchführung der DAB Reaktion auftraten. Die Färbung von Basalmembran und Pigmentzellen ist auf freie Aldehydgruppen zurückzuführen, da nach Inkubation in NaBH_4 die DAB-Reaktion diese Strukturen nicht mehr färbte. Die Präabsorption der beiden GAD Antikörper erfolgte mit je $300 \mu\text{M}$ GAD (Sigma, Typ II). Der präabsorbierte GAD II Antikörper zeigte keine unspezifische neuronale Zellfärbung (Abb. 17C), wohingegen der präabsorbierte GAD I Antikörper einige Monopolarzellkörper färbte (Abb. 17D). Diese Monopolarzellkörper wurden auch gelegentlich durch den GABA Antikörper gefärbt, aufgrund der unspezifischen GAD I Färbung jedoch nicht als GABAerg eingestuft. Die Präabsorption des GABA Antikörpers mit $10 \mu\text{M}$ des GABA-GA-BSA Konjugates unterband jegliche Zellfärbung (Abb. 17 B).

Als zusätzliche Kontrolle der spezifischen Färbung wurde der GABA Antikörper mit $10 \mu\text{M}$ eines Glycin-GA-BSA Konjugates und in einem weiteren Experiment mit einem Dopamin-GA-BSA Konjugat präabsorbiert. Beide Konjugate konnten die mit dem GABA Antikörper erhaltene typische Färbung GABAerger Neurone nicht unterdrücken. Die Präabsorption des GABA Antikörpers mit einem BSA-GA Konjugat beeinträchtigte die typische Anti-GABA Färbung nicht.

3.2.1.3 Photorezeptoren R7-R8

Die Abbildung 18 zeigt die GABAerge Färbung einzelner Fasern die von der Retina kommen, durch die Basalmembran ziehen und sich durch die Lamina bis ins 1. optische Chiasma erstrecken. Nur die Photorezeptoren R7 und R8 entspringen aus der Retina und ziehen über Lamina und Chiasma in die Medulla (Campos-Ortega und Strausfeld 1972).

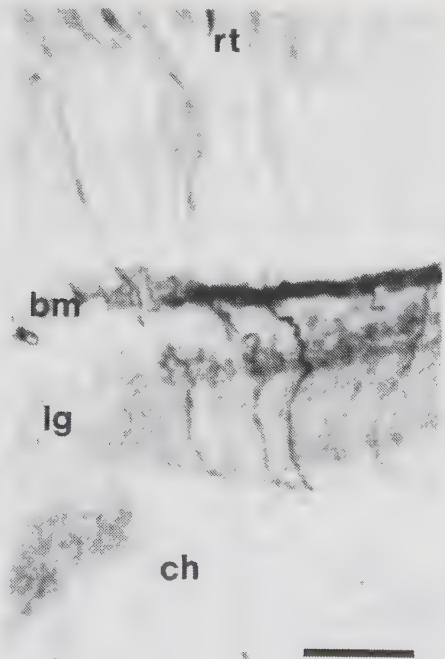


Abb.18 Eine dunkeladaptierte Retina, die nach Inkubation in GABA und Gabaculin mit dem GABA Antikörper gefärbt wurde, zeigt einige gefärbte Photorezeptoren. R7/8 Axone sind in ihrem Verlauf von der Retina (rt) durch Basalmembran (bm) und Lamina (lg) in das Chiasma (ch) hinein zu verfolgen.
Maßstab = 50 μ m

Photorezeptor R7 und R8 sind in jedem Ommatidium der Retina in Tandemanordnung enthalten (Melamed und Trujillo-Cenoz 1968). Die Somata von R7 liegen im distalen Teil, die von R8 im proximalen Teil der Retina. Längsschnitte der Retina zeigten hauptsächlich längliche

Strukturen die bis dicht an die Cornea heranreichten und durch ihre Somata als R7 identifiziert werden konnten (Abb. 19). In einem Längsschnitt der Retina konnten jedoch auch einzelne GABAerge R8 Photorezeptoren beobachtet werden (Abb. 20).

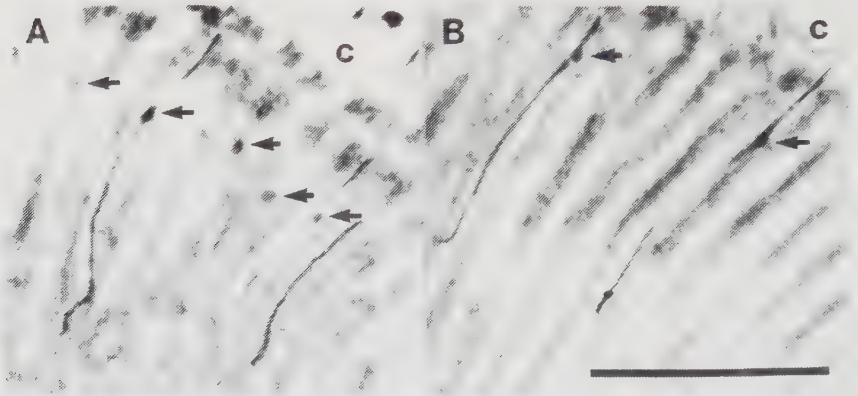


Abb.19 A und B Färbungen mit Anti-GABA von R7 Photorezeptoren im distalen Bereich der Retina. Vor Durchführung der Immuncytochemie wurden diese Augen dunkeladaptiert und mit GABA und Gabaculin inkubiert. Die Pfeile verweisen auf die Zellkerne von R7. Cornea (c); Maßstab = 125 μ m



Abb.20 R8 Photorezeptoren sind im proximalen Bereich der Retina, nach Dunkeladaptation und Präinkubation mit GABA und Gabaculin durch den GABA-Antikörper angefärbt. Die Pfeile weisen auf die Zellkerne von R8 hin. Maßstab = 50 μ m

Schnitte die senkrecht zur Ommatidienachse geführt und mit Anti-GABA gefärbt wurden zeigten im distalen Retinabereich deutlich die Anfärbung eines einzelnen Photorezeptors pro Ommatidium (Abb.21A,22) in der Position von R7 (Dietrich 1909). Photorezeptoren R7 konnten ebenfalls mit Anti-GAD gefärbt werden. Die Färbung war jedoch in parallel zur Ommatidienachse geführten Schnitten äußerst schwach. Senkrecht zur Ommatidienachse ausgeführte Schnitte im distalen Bereich der Retina zeigten jedoch klar mit Anti-GAD gefärbte R7 Photorezeptoren (Abb. 21B). In keinem Fall konnte mittels Anti-GAD die Färbung eines R8 Photorezeptors nachgewiesen werden.

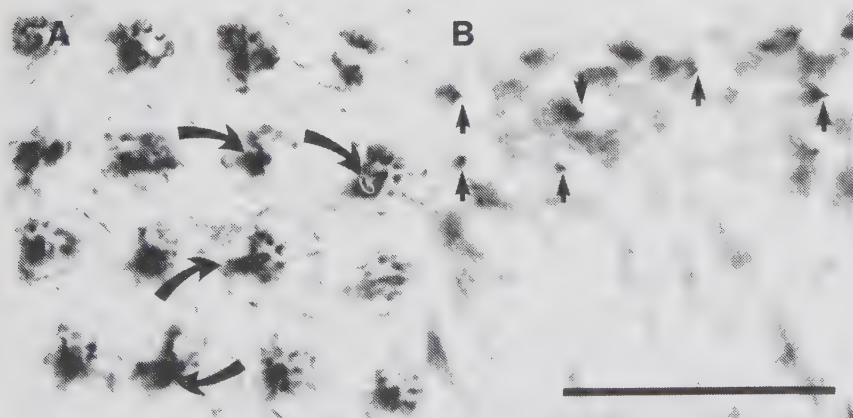


Abb.21 A: Dieser Querschnitt einer Retina im distalen Bereich zeigt 16 Ommatidien, in denen je ein R7 Photorezeptor (Pfeile) mit Anti-GABA angefärbt wurde. Die Retina wurde vor der immunocytochemischen Behandlung dunkeladaptiert und in GABA und Gabaculin inkubiert und mit Fixativ A fixiert.

B: Ein Schnitt der distalen Retina unterhalb der Cornea zeigt nach der GAD I Antikörperreaktion ebenfalls gefärbte R7 Photorezeptoren (Pfeile). Maßstab = 50 μ m

In Ommatidienquerschnitten der proximalen Retina konnten in 3 Fällen, nach Fixierung mit Fixativ B, mit Anti-GABA gefärbte R8 Photorezeptoren und ebenfalls GABAerge Axone von R7 festgestellt werden (Abb.22). GABAerge Photorezeptoren R8 waren in zwei mit Fixativ A behandelten, dunkeladaptierten Augen nach Präinkubation mit GABA und Gabaculin feststellbar.



Abb.22 Bei Behandlung mit Fixativ B sind in jedem Ommatidium einer querschnittenen Retina mit Anti-GABA gefärbte Photorezeptoren zu erkennen. Die geschwungenen Pfeile weisen auf Ommatidien hin, in denen die Färbung des R8 Photorezeptors als auch des Photorezeptoraxons von R7 gut zu erkennen ist. Gerade Pfeile weisen auf Ommatidien mit einem gefärbten Photorezeptor R7 im distalen Bereich der Retina hin. Mehrere Ommatidien im distalen Retinabereich zeigen die Färbung des Photorezeptors R7. Maßstab = 50 μ m

Die vorliegenden Ergebnisse lassen keine eindeutige Entscheidung zu ob alle R7 Photorezeptoren GABAerg sind. In 8 untersuchten Fliegen konnte jedoch keine Region in der Retina gefunden werden, in der GABAerge R7 Photorezeptoren offensichtlich fehlen. Die GABAergen Färbungen der Photorezeptoren R8 lassen auch keine Entscheidung über deren Anzahl und Verteilung zu.

3.2.1.4 Zentrifugale C2 Zellen

Das zweite Fasersystem das von allen 3 Antikörpern, wenn auch in unterschiedlicher Stärke, gefärbt wurde zeigt Abbildung 23.

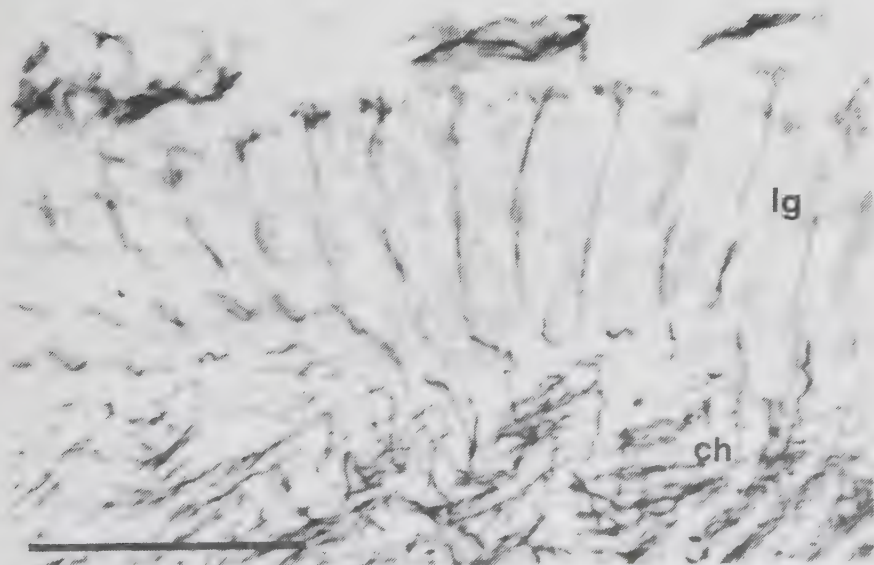


Abb.23 Ein Horizontalschnitt zeigt in fast jeder Cartridge der Lamina (lg) gefärbte C2 Fasern. Die Fasern sind in ihrem Verlauf vom Chiasma (ch) her gut zu verfolgen. Färbung mit dem GAD II Antikörper. Maßstab = 50 μ m

Im Gegensatz zu R7 Photorezeptoren, die mit Anti-GAD meist nur sehr schwache Färbungen aufwiesen, wurden diese Fasern stark mit Anti-GAD gefärbt. Diese Fasern entspringen offensichtlich aus den sich überkreuzenden Fasern des Chiasma und setzen sich in die Lamina fort, wo sie an der distalen Grenze enden. Eine etwas schwächere Färbung der gleichen Zellen mit Anti-GABA zeigt Abb.24.

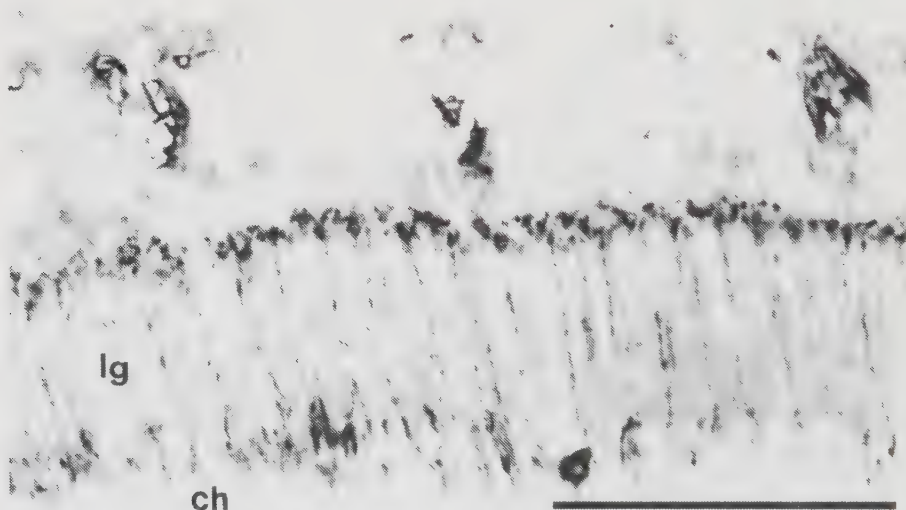


Abb.24 Frontalschnitt der durch Anti-GABA gefärbte C2 Fasern in der Lamina (lg) zeigt. Chiasma(ch).Maßstab = 50 μ m

Die Fasern verlaufen in der Lamina parallel zueinander und zu der Längsachse der Neuroommatidien, wobei ein Verhältnis von 1:1 zwischen Faser und Neuroommatidium besteht. An der distalen Laminagrenze enden die Fasern mit 2, meistens 3 hakenförmigen Strukturen die knopfartige Verdickungen aufweisen (Abb. 25).

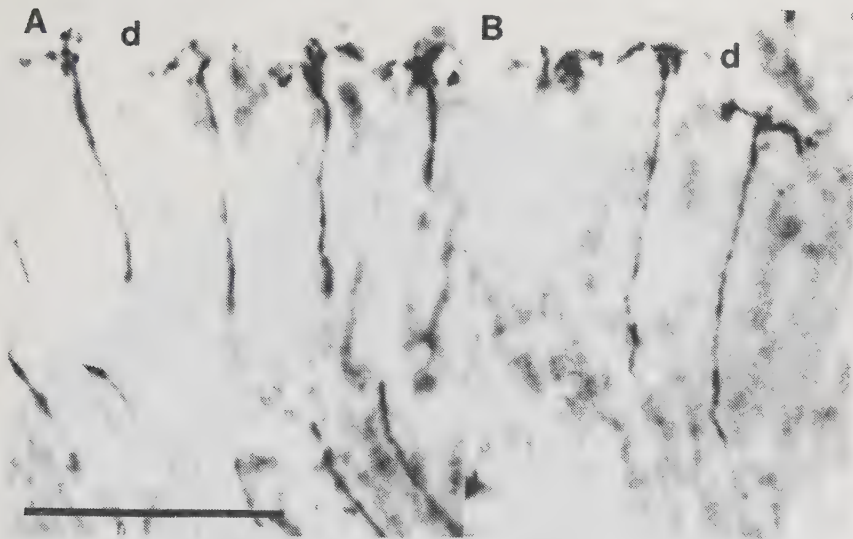


Abb.25 A und B Horizontalschnitte die C2 Fasern der Lamina zeigen, lassen teilweise deutlich die 3 hakenartigen, mit Knöpfchen besetzten Endstrukturen an der distalen Laminagrenze (d) erkennen. Die Färbung erfolgte mit Anti-GABA nach Präinkubation in GABA und Gabaculin. Maßstab = 50 μ m

Identische Strukturen die in der Lamina von Dipteren mit Hilfe der Golgifärbung nachgewiesen wurden (Strausfeld 1971,1976), konnten einem charakteristischen Neuron, der C2 Zelle, zugeordnet werden. Die Zellkörper dieser C2 Zellen liegen zentral der proximalen Medullagrenze. Deshalb sollten Zellkörper in dieser Region mit Anti-GABA und Anti-GAD nachgewiesen werden. Färbungen von Zellkörpern in dieser Region wurden sowohl mit Anti-GAD (Abb. 26) als auch mit Anti-GABA (Abb. 27) erhalten. Im allgemeinen konnten jedoch nur wenige gefärbte Zellkörper direkt posterior zur Medullagrenze entdeckt werden. Viele mögliche C2 Zellkörper wurden mehr anterior zur Lobula hin entdeckt (Abb. 27).

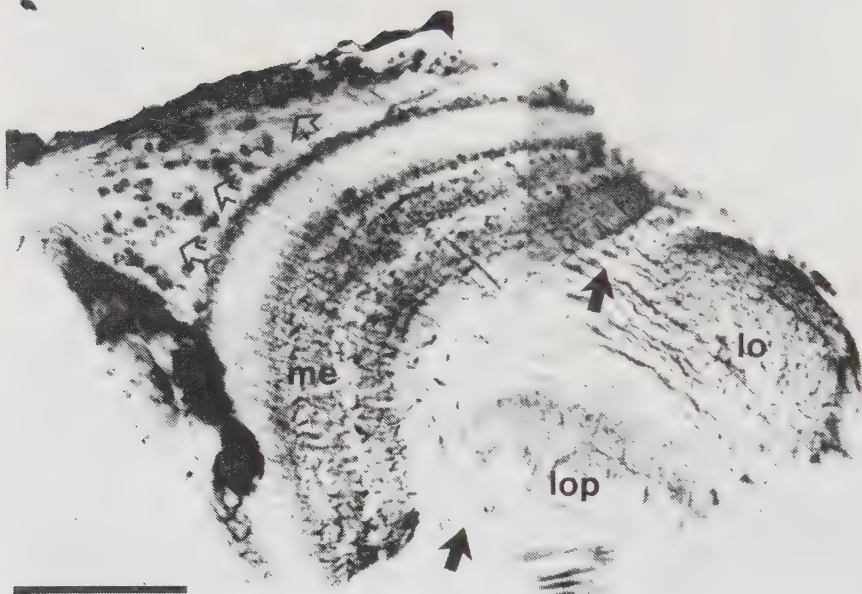


Abb.26 Fotomontage eines Schnittes durch Medulla (me), Lobula (lo) und Lobulaplatte (lop). Die Färbung erfolgte mittels des GAD II Antikörpers. Die Medulla weist eine deutlich schichtenartige Färbung auf. Auffallend sind auch die von der Lobula in Richtung Medulla ziehenden Fasern, die möglicherweise zu Y-Zellen gehören. Distal der Medulla in der Zellkörperrinde liegen viele gefärbte Somata (Offene Pfeile). Die schwarzen Pfeile weisen auf gefärbte, putative C2 Zellkörper proximal der Medulla hin. Maßstab = 125 μm

Abb.27 Fotomontierter Horizontalschnitt der die Färbungen des GABA Antikörpers in Medulla (me), Lobula (lo) und Lobulaplatte (lop) zeigt. Die deutlich geschichtete Färbung der Medulla ist klar zu erkennen. Die offenen Pfeile weisen auf die vielen gefärbten Zellkörper in der Zellkörperrinde distal der Medulla hin. Eine Ansammlung gefärbter, möglicher C2 Zellkörper ist proximal der Medulla hinter der Lobula zu sehen (großer schwarzer Pfeil). Der kleine schwarze Pfeil weist auf einen mehr zentral gelegenen C2 Zellkörper hin. Maßstab = 125 μm



Eine Anhäufung möglicher C2 Zellkörper wurde mit Anti-GABA proximal der Medulla hinter der Lobula gefärbt. Durch die Medulla verlaufende Fasern, wie auch die C2 Faser, konnten meist nur bruchstückhaft gefärbt werden. In einem Fall konnte jedoch der Faserverlauf einer C2 Zelle in der Medulla durchgehend angefärbt werden (Abb. 28). Die aus dem Zellkörper entspringende sehr dünne Faser verläuft 15 μ m entlang der Medullagrenze um sich dann um 90° in Richtung Medulla zu drehen und durch diese hindurch, auf Chiasma und Lamina, hin zu ziehen. Horizontale Verzweigungen beim Durchzug durch die Medulla und eine zurückweisende Verzweigung des Axons im distalen Medullabereich sind C2-typische Strukturen (Strausfeld and Nässel 1981, fig. 38).

Die Zellkörperrinde zwischen Medulla und erstem optischen Chiasma enthält viele GABAerge Zellkörper (Abb. 26,27). In diesem Gebiet liegen viele Zellkörper von denen zentripetale Fasern entspringen, wie die transmedullären Zellen und die medullären Amakrinzellen.

In diesem Gebiet liegen aber auch die Zellkörper zentrifugaler Zellen die Lamina und Medulla miteinander verbinden. Dazu gehören z.B. die T1 Zelle oder die Tangentialzellen. Da in der Lamina keine zu diesen Zelltypen gehörenden Strukturen entdeckt werden konnten, müssen die Zellkörper zwischen Medulla und Chiasma als Zellkörper zentripetaler Zellen angesehen werden.

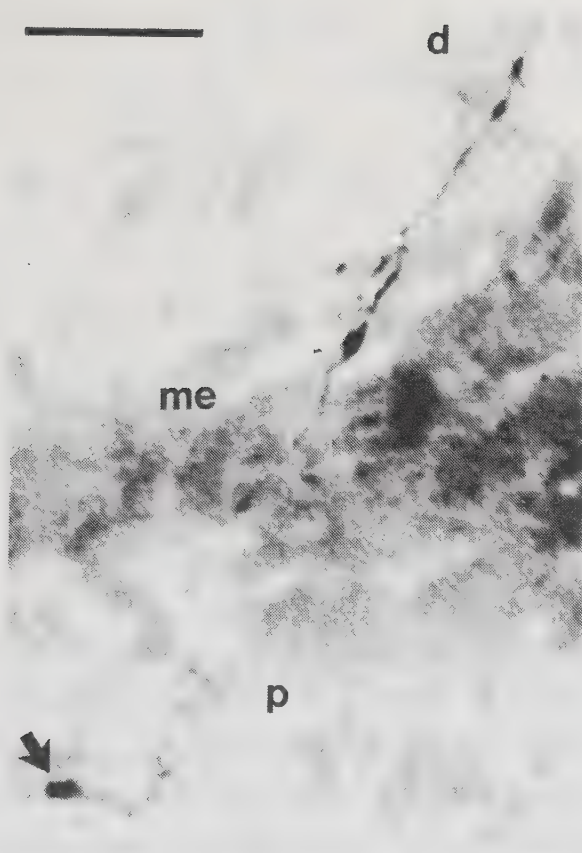


Abb.28 Der medulläre Anteil einer C2 Zelle wurde nach Präinkubation mit GABA und Gabaculin mit Anti-GABA gefärbt. Der Zellkörper (Pfeil) liegt an der proximalen Grenze (p) der Medulla (me). Die Faser zeigt in ihrem Verlauf Verdickungen und im äußeren Drittel der Medulla (d) eine C2-typische, rückwärts gerichtete, hakenartige Verzweigung. Maßstab = 50 μ m

3.2.2 Intrazelluläre Ableitungen mit Beeinflussung der GABAergen Transmission

3.2.2.1 Pikrotoxin

Viele neuropharmakologische und elektrophysiologische Untersuchungen verwenden Pikrotoxin als spezifischen GABA Antagonisten (Tapia 1975). In Vertebraten wird die Wirkung von Pikrotoxin auf eine Bindung an der GABA-Ionophore zurückgeführt (Akaike et al. 1985). In Invertebraten wird Pikrotoxin jedoch als nicht-kompetitiver Hemmer von GABA angesehen (Teichberg 1980), der am GABA-Rezeptor wirkt.

Die ersten Hinweise einer Pikrotoxin (PTX) Wirkung auf die Monopolaren L1-L2 ergaben sich aus Ableitungen verschiedener Monopolaren vor und nach einer etwa 20 minütigen PTX Inkubation (5×10^{-3} M) (Abb.29). Alle Monopolaren zeigten vor der Superfusion mit PTX normale Antworten mit einer schnellen depolarisierenden Off Antwort auf Licht-Aus. Diese Off Antwort war nach PTX Applikation verschwunden.

Eine langzeitige Monopolarenableitung unter PTX war in 3 Fällen möglich. Die Abbildung 30 zeigt die Veränderungen einer Monopolarenantwort auf die Badapplikation von PTX (10^{-4} M). Nach 8 min ist die Amplitude der Off-Antwort bereits reduziert. Nach einer Applikationsdauer von 18 min ist die Off-Antwort zum größten Teil eliminiert. Das Rauschen der Zelle ist verschwunden. Die Amplitude der

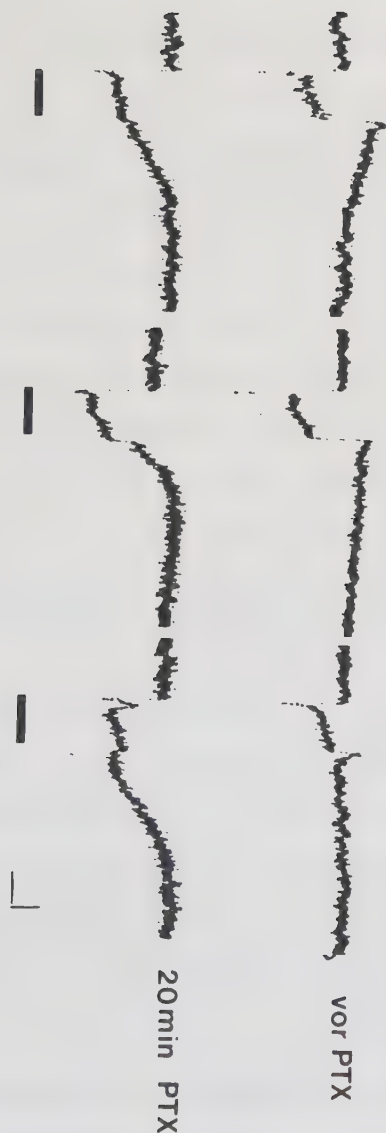


Abb.29 Veränderungen in den Antworten verschiedener Monopolaren nach einem 20 minütigem Pikrotoxinbad (5×10^{-3} M). Vor Pikrotoxinzugabe abgeleitete Monopolarzellen zeigen deutlich bei Licht - Aus eine Off-Antwort. Nach 20 min Pikrotoxin ist diese Off-Antwort bei keiner der abgeleiteten Monopolaren mehr zu beobachten. Das Rauschen der gezeigten Monopolarantworten ist auf das hohe Eigenrauschen der verwendeten Elektrode zurückzuführen.

Log I = -1,5; Kalibrierung: 10 mV, 100 ms

On-Antwort war gleichgeblieben. Das Ruhepotential dieser Zelle zeigte einen negativen Abfall von 10 mV. Das Ruhepotential der beiden anderen unter PTX abgeleiteten Monopolaren zeigte Schwankungen, die jedoch bei einer LMC stark in negative Richtung tendierten. Die Off-Antwort wurde auch in den zwei anderen Monopolaren unter PTX Einfluß eliminiert, jedoch zeigten beide Zellen auch eine Abnahme der On Amplitude von etwa 25% gegenüber dem ursprünglichen Wert. Das zeitliche Auftreten der PTX Wirkung war bei diesen beiden Monopolaren vergleichbar mit der in Abbildung 30 gezeigten.

3.2.2.2 Bicucullin Methjodid (BM), Imipramin

Obwohl Bicucullin in Vertebraten als potenter GABA Antagonist angesehen wird (Tapia 1975) zeigte dieses Pharmaka im Nervengewebe von 2 Heuschreckenarten keine Bindung an den GABA Rezeptor (Breer und Heilgenberg 1985; Lunt et al. 1985). In GABA Bindungsstudien mit Nervengewebe aus Köpfen der Hausfliege *Musca domestica* konnte BM, jedoch in annähernd millimolarer Konzentration, GABA verdrängen (Lunt et al. 1985).

3 Versuche mit Bicucullinmethjodid (10^{-3} M) zeigten keine bzw. in einem Fall höchstens eine äußerst geringfügige Wirkung. Diese Inkubation für über 25 min in BM reduzierte die Off-Antwort um ca. 10% wobei jedoch eine annähernd gleich große Reduzierung der On Antwort zu beobachten war.

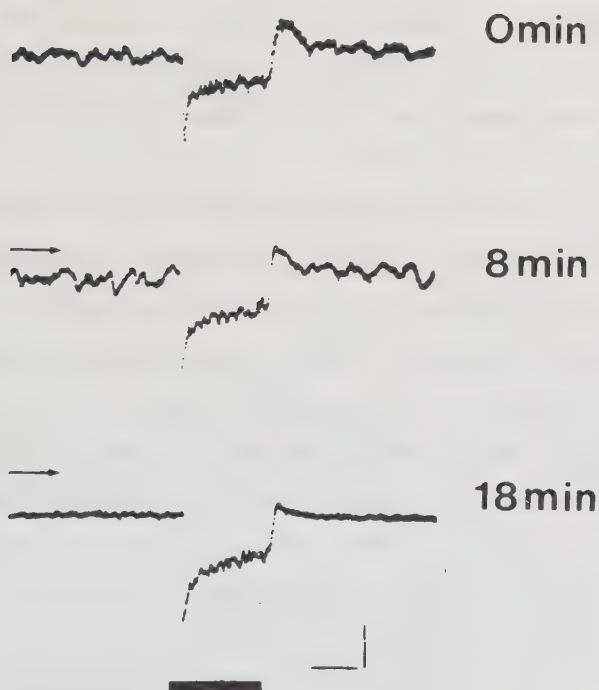


Abb.30 Veränderungen der Lichtantwort einer Monopolaren unter badappliziertem Pikrotoxin (10^{-4} M). Nach 8 min ist die Off-Antwort der Zelle sichtbar verkleinert. 18 min nach PTX zeigt die Zelle keine Off-Antwort mehr. Das Rauschen der Zelle ist ebenfalls verschwunden. Die Pfeile geben das Niveau des Ruhepotentials vor PTX Zugabe an. Log I = -1,5; Kalibrierung: 10 mV, 50 ms

Breer und Heiligenberg (1985) zeigten in Bindungsstudien, daß Imipramin ein äußerst potenter Inhibitor der GABA Bindung in der Heuschrecke ist.

2 Imipraminapplikationen (10^{-2} M), z.T. über einen Zeitraum von 20 min, zeigten jedoch keine Wirkungen auf das LMC Potential.

3.3 Dopaminerge Zellen

3.3.1 Immuncytochemie

3.3.1.1 Übersicht

Dopaminerge Zellen wurden durch einen im Hasen gewonnenen, gegen Dopamin gerichteten Antikörper immunocytochemisch nachgewiesen.

Der Dopamin Antikörper färbte spezifische Strukturen in Retina und Lamina von *Calliphora erythrocephala* (Abb.31). Die Medulla sowie die Lobula wiesen mit der Dopamin Immuncytochemie stark variierende Färbeintensitäten auf.

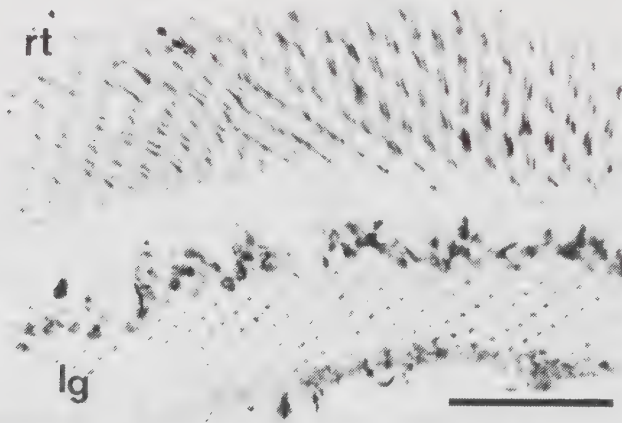


Abb.31 Frontalschnitt durch Retina (rt) und Lamina ganglionaris (lg) nach der Immuncytochemie mit dem Dopamin Antikörper. In der Retina sind in jedem Ommatidium 2 Photorezeptoren gefärbt. Direkt über der Lamina sind gefärbte Monopolarzellkörper sichtbar. Die quergeschnittenen Cartridges in der Lamina zeigen in ihrer Mitte stark gefärbte dopaminerge axonale Strukturen. Außerhalb der Cartridge sind teilweise noch schwächer gefärbte Axone zu sehen. Maßstab = 125 μ m

Ein ähnlicher Befund war bereits bei der ACh Immuncytochemie erhoben worden. Da auch bei der Immuncytochemie von Dopamin, wie bei der von ACh, Fasern mit größerem Durchmesser reproduzierbarer gefärbt wurden als solche mit kleinerem Durchmesser liegt auch hier der Schluß nahe, daß ein Schritt in der histologischen Aufbereitung des Gewebes dafür verantwortlich gemacht werden muß.

Die Präabsorption mit 10 μ M eines Dopamin-GA-BSA Konjugats unterband jegliche Dopaminfärbung (Abb. 32). Diese typische Färbung konnte weder durch die Präabsorption von Anti-Dopamin mit 10 μ M eines GABA-GA-BSA Konjugats noch durch die Präabsorption mit 10 μ M eines Glycin-GA-BSA Konjugates unterdrückt werden. Die Präabsorption mit 10 μ M BSA bzw. mit 10 μ M BSA-GA beeinträchtigte die Färbung dopaminerger Strukturen nicht.

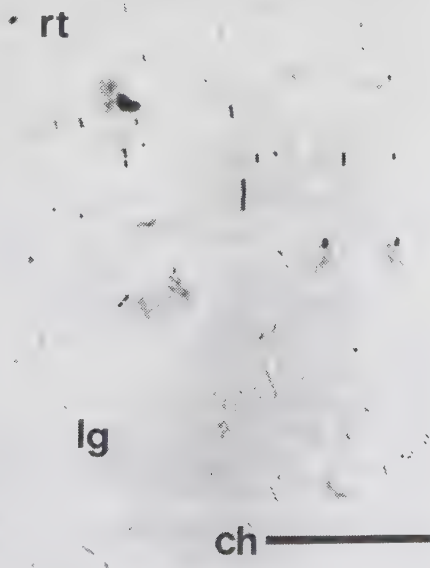


Abb.32 In einem Frontalschnitt der mit Anti-Dopamin nach Präabsorption mit 10 μ M des Dopamin-GA-BSA Konjugates inkubiert wurde, ist keine unspezifische Färbung zu erkennen. Maßstab = 125 μ m

3.3.1.2 Photorezeptoren R7-R8

Die Abbildung 33 zeigt, in einem tangential durch die Ommatidien der proximalen Retina geführten Schnitt kurze, mit Anti-Dopamin gefärbte Faserstücke die immer paarweise nebeneinander verlaufen.

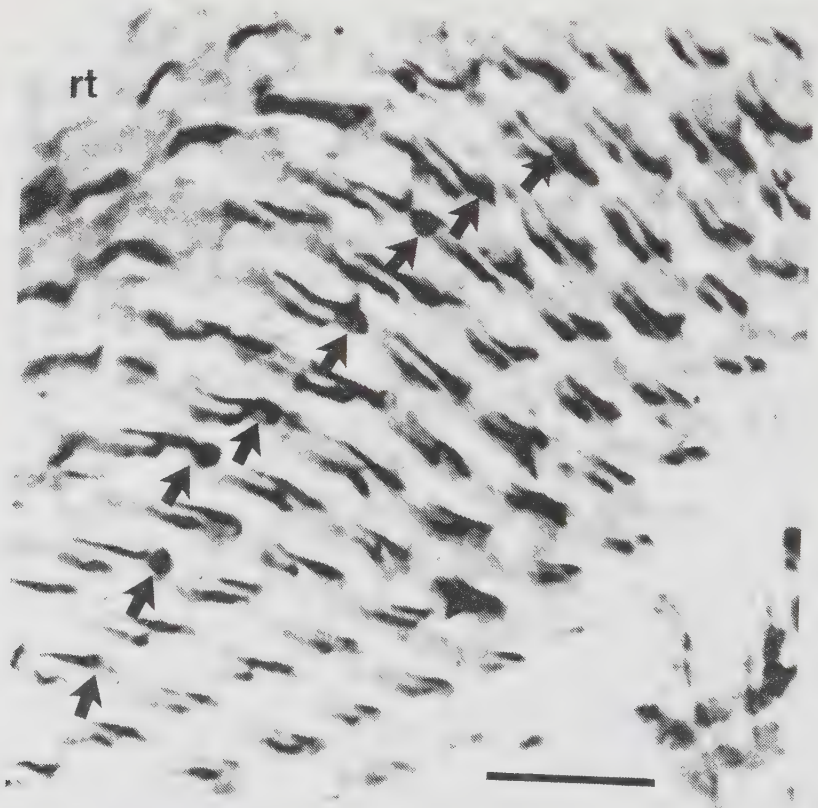


Abb.33 Ein Tangentialschnitt des proximalen Retinabereichs zeigt nach Färbung durch die Immuncytochemie mit Anti-Dopamin in fast jedem Ommatidium 2 stark gefärbte Photorezeptoren R7/8. Die Pfeile zeigen auf die Zellkerne von R8. Retina (rt); Maßstab = 50 μ m

Mehrere gefärbte Zellkörper sind dabei in einem Abstand von ca. 100 μm distal der Basalmembran zu erkennen. In der Retina liegen in dieser Region die Zellkörper der Photorezeptoren R8. Ein Schnitt parallel zur Ommatidienlängsachse macht mit der Färbung durch den Dopaminantikörper längsverlaufende Strukturen sichtbar (Abb. 34), und z.T. auch deren Zellkern ca. 80 μm bis 100 μm distal der Basalmembran.

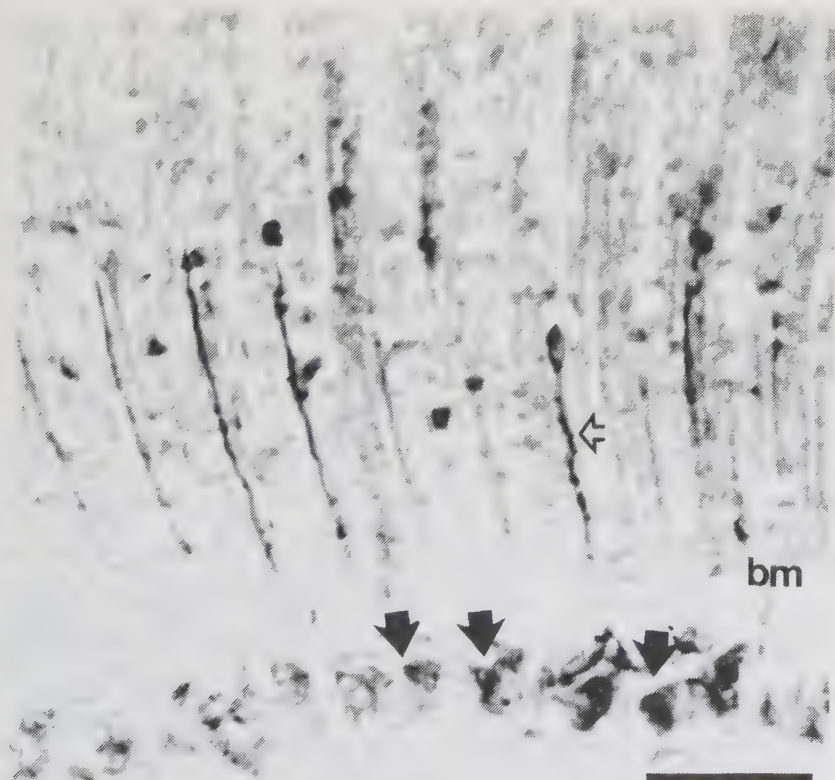


Abb.34 Ein Längsschnitt der proximalen Retina zeigt nach Inkubation mit dem Dopamin Antikörper gefärbte Photorezeptoren. Der offene Pfeil weist auf eine Faser hin, die durch die Lage des Zellkernes, eindeutig als Photorezeptor R8 zu identifizieren ist. Am unteren Bildrand sind einige gefärbte Monopolarzellkörper (schwarze Pfeile) zu erkennen. Basalmembran (bm); Maßstab = 50 μm

Ein Schnitt durch die proximale Retina (Abb. 36B), senkrecht zur Ommatidienachse, läßt deutlich gefärbte Photorezeptoren in der R8 Position erkennen (Dietrich 1909). Durch die Lage der Zellkerne (Abb. 33 und 34) und durch die Lage in quergeschnittenen proximalen Ommatidien (Abb. 36B) ist somit der Photorezeptor R8 eindeutig als dopaminerg zu identifizieren.

Ein Schnitt durch die distale Retina (Abb. 37B) zeigt auch hier eindeutig einen gefärbten Photorezeptor pro Ommatidium in der Position von R7.

Die Färbungen von R7 und R8 waren in Querschnitten der Ommatidien in 6 Fliegen reproduzierbar zu erkennen. In Schnitten parallel zur Ommatidienachse waren meist nur kurze Faserstücke angefärbt, sodaß nur in 2 Fliegen diese Fasern als R8 Photorezeptoren identifiziert werden konnten. In keinem Fall konnte in längsgeschnittenen Ommatidien eine eindeutige Identifizierung eines R7 Photorezeptors im distalen Retinabereich zweifelsfrei erfolgen. Der Verlauf in Lamina und Chiasma war in Schnitten parallel zur Verlaufsrichtung der Fasern meist nur bruchstückhaft möglich. In einigen Querschnitten der laminären Cartridges (Abb. 35) zeigten sich jedoch, neben anderen markierten Strukturen, an der putativen Stelle des Durchzugs von R7/8 durch die Lamina (Strausfeld 1971) klar dopaminerge Axonfärbungen.

3.3.1.3 Monopolare L1-L2

Die quergeschnittenen Cartridges der Abbildung 35 zeigen aber auch noch 2 stark gefärbte Axonstrukturen, die in der Mitte jeder Cartridge liegen und von den Terminals der 6 ungefärbten Photorezeptoren R1-R6 umgeben sind. Inmitten der Rezeptorkrone liegen die Axone der großen Monopolarzellen L1-L2 (Boschek 1971).

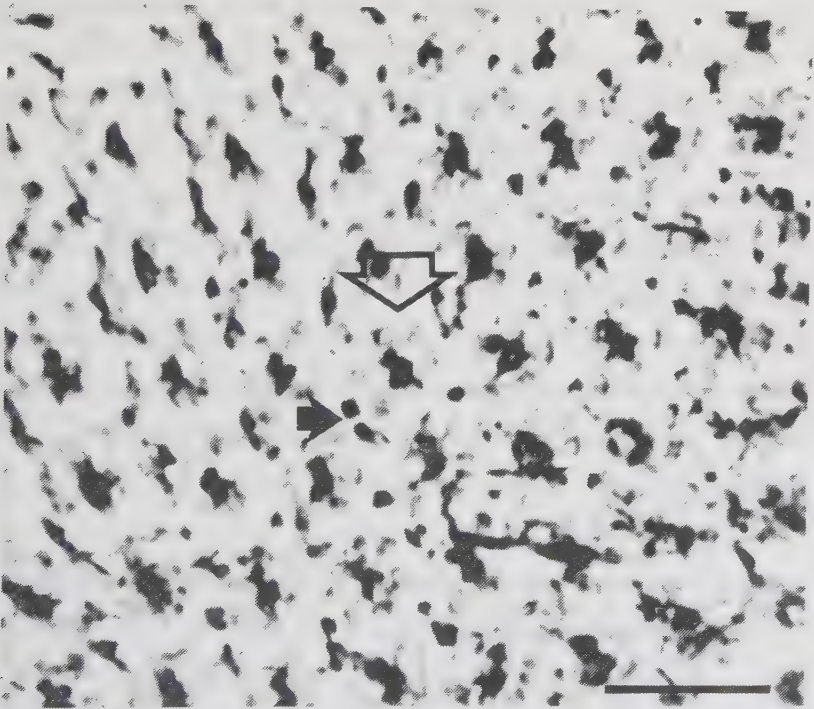


Abb.35 Quergeschnittene Cartridges in der Lamina zeigen nach der Immuncytochemie mit Anti-Dopamin mehrere stark gefärbte Axone. Der offene Pfeil weist auf eine Cartridge hin in der diese einzelnen Axone besonders deutlich voneinander zu unterscheiden sind. Inmitten der ungefärbten Endigungen der 6 Photorezeptoren R1-R6 sind 2 Axone gefärbt, die aufgrund dieser Lage unschwer als Axone der Monopolaren L1-L2 identifiziert werden können. Der schwarze Pfeil verweist auf 2 außerhalb der Rezeptorkrone gelegene Axone die den Photorezeptoren R7 und R8 zuzuordnen sind. Maßstab = 50 μm

In Querschnitten der Cartridges von 5 Fliegen konnten L1-L2 Axone deutlich identifiziert werden. Die Monopolarzellkörper liegen distal der Lamina in der "nuclear layer". Anti-Dopamin färbte in dieser Region Zellkörper (Abb.31,34), die aufgrund des Faserverlaufs in der Lamina als L1-L2 Zellkörper anzusprechen sind.

In allen Längsschnitten war die Färbung mit Anti-Dopamin, abgesehen von den Monopolarzellkörpern, wesentlich schwächer als in Schnitten quer zur Faserverlaufsrichtung. Deshalb konnte in längsgeschnittenen Cartridges von 3 Fliegen zwar dopaminerge Faserstrukturen in der Lamina beobachtet werden, wobei jedoch meist nicht zu unterscheiden war, ob diese Fasern von Photorezeptoren R7/8 oder den Monopolaren L1-L2 stammten. Nur in wenigen Fällen konnten einige Monopolaraxone der Lamina bis zu ihrem Zellkörper verfolgt werden. Nur einmal konnte eine einem Monopolarzellkörper entspringende Faser durch die Lamina hindurch und in das Chiasma hinein verfolgt werden.

3.3.1.4 Immunocytochemie dopaminerger Strukturen nach 6-OHDA Injektion

6-Hydroxydopamin wird von dopaminergen Zellen aufgenommen und setzt beim Abbau Wasserstoffperoxid frei (Negishi et al. 1982). Dopaminerge Zellen sollten deshalb nach 6-OHDA Injektionen in der Immunocytochemie mit Anti-Dopamin durch eine Reduzierung der Färbung bzw. deren Fehlen

charakterisiert sein.

Da bereits GABAerge Färbungen der Photorezeptoren R7/8 vorlagen wurde die Beeinflussung der dopaminergen Färbung der Photorezeptoren R7/8 durch 6-OHDA besonders beachtet. Ringerinjizierte Kontrolltiere zeigten geringfügige Änderungen des Spontanverhaltens, wohingegen die mit 6-OHDA injizierten Testtiere teilweise bereits nach 24 h eine katatonisch anmutende Starre einnahmen. Nur eine einzige Fliege (von 15 mit 6-OHDA injizierten) war nach 72 h noch am Leben. Je 2 Fliegen wurden 27 h bzw. 42 h nach 6-OHDA Injektion immuncytochemisch mit dem Dopamin Antikörper untersucht. 27 h nach 6-OHDA konnte keine Färbung von Monopolarzellkörpern beobachtet werden. Die Färbung in der Lamina war nur noch in Teilbereichen einer axonalen Färbung von L1-L2 zuzuordnen. Diese Bereiche zeigten dann aber auch keine homogene Färbung des gesamten Faserquerschnittes, sondern nur eine Färbung am Rand, wahrscheinlich der Fasermembranen. Eine stark aufgelockerte Färbung zeigte sich auch in den Fliegen die 42 h bzw 72 h nach 6-OHDA Injektion immuncytochemisch untersucht wurden. Da aber eine Färbung der Fasermembranen auch in nichtinjizierten Fliegen schon zu beobachten gewesen war, konnte diese Änderung in der Färbung von L1-L2 nicht alleine auf die Injektion von 6-OHDA zurückgeführt werden.

Ein klares Bild bot sich bei der Bewertung der 6-OHDA Wirkungen auf die Photorezeptoren R7/8 in der Retina. Die zur Kontrolle mit Ringer injizierten Fliegen zeigten

keine bzw. nur äußerst geringe histologische Zerstörungen und somit auch fast keine Beeinträchtigungen der dopaminergen Färbung (Abb.36 B, 37 B).

6-OHDA zeitigte bereits 27 h nach Injektion erste Wirkungen (Abb.36 A). Die dopaminergen Photorezeptoren in der Retina waren entweder stark geschrumpft oder schon völlig zerstört. Im ersten Fall waren noch kleine mit Anti-Dopamin gefärbte Reste des Photorezeptors zu erkennen, während im zweiten Fall keine Färbung mehr erkennbar war. In beiden Fällen begann sich dabei der Photorezeptor von den Pigmentzellen abzulösen, wohingegen sich die Lage und Struktur von R1-R6 nicht veränderten.

Eine 42 h nach 6-OHDA durchgeführte Immuncytochemie zeigt bereits schwerwiegendere Veränderungen. Die Ablösung und Zerstörung der Photorezeptoren war weiter fortgeschritten, wobei nun auch größere Bereiche in der Umgebung des Photorezeptors zerstört waren (Abb.37A). Die Kontrolle zeigt dagegen eine gute histologische Erhaltung, wobei allerdings auch hier bereits geringfügige Ablösungen einzelner Photorezeptoren zu beobachten waren (Abb.37B). In keinem Fall konnte jedoch ein zerstörter Photorezeptor R7/8 beobachtet werden. Die dopaminerge Färbung war nicht beeinträchtigt. Die Zerstörung der Photorezeptoren R7/8 durch 6-OHDA ist ein zusätzlicher Hinweis auf ihre dopaminerge Natur.

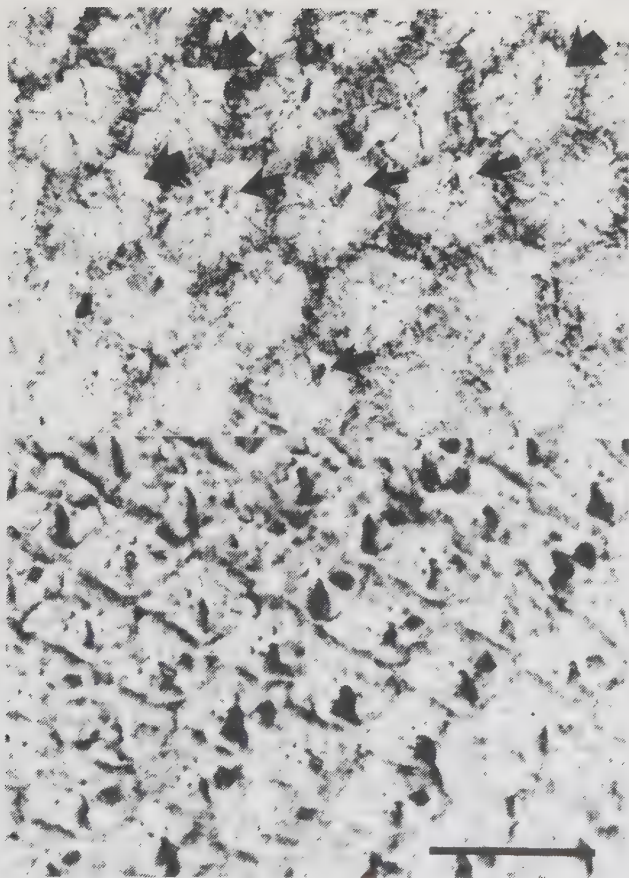


Abb.36 A: Schnitte quer zur Ommatidienlängsachse aus dem distalen Bereich der Retina, die 27 h nach der Injektion von 6-OHDA der Immuncytochemie mit dem Dopamin Antikörper unterzogen wurden, zeigen starke Schrumpfungen (kleine Pfeile) bzw. eine vollständige Zerstörung (große Pfeile) der Photorezeptoren R7. Diese Veränderungen sind in allen Ommatidien zu beobachten. Die Photorezeptoren R1-R6 zeigen dahingegen eine gute histologische Erhaltung.

B: Schnitte der proximalen Retina, die 27 h nach der Injektion von Fliegenringer mit Anti-Dopamin inkubiert wurden. In den einzelnen Ommatidien sind der Photorezeptor R7 bzw R8 gefärbt. In einigen Ommatidien sind sowohl R7 als auch R8 gefärbt. Alle Photorezeptoren zeigen eine gute histologische Erhaltung. Maßstab = 50 μ m

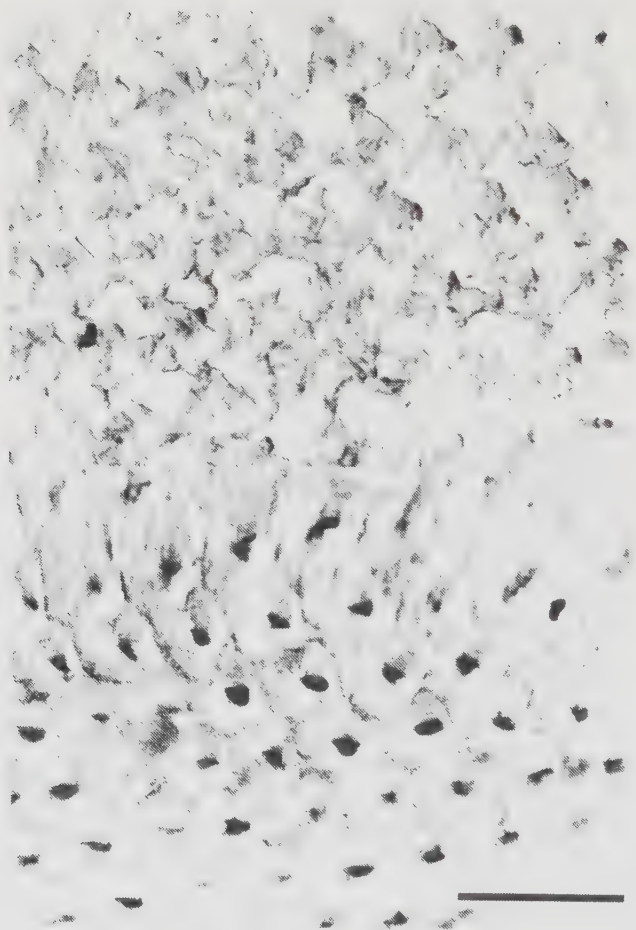


Abb.37 A: Querschnitt durch die Ommatidien einer Retina, die 42 h nach der Injektion von 6-OHDA immunocytochemisch mit Anti-Dopamin gefärbt wurde. Die Photorezeptoren R7/8 sind größtenteils zerstört, allerdings hat die Zerstörung auch schon teilweise auf die Photorezeptoren R1-R6 übergegriffen.

B: Querschnitt der distalen Retina, die 42 h nach der Injektion von Fliegenringer mit der Dopaminimmunocytochemie gefärbt wurde. Außer einer geringfügigen Ablösung einzelner Photorezeptoren R7 ist die Färbung als auch die Struktur von R7 nicht beeinträchtigt.

Maßstab = 50 μ m

3.4 Immuncytochemie von Glucagon, Met-Enkephalin und Neurotensin

In der Retina vieler Vertebraten wurden immuncytochemisch eine Reihe von Peptiden nachgewiesen. Die Funktion dieser retinalen Peptide wie auch ihre möglichen Interaktionen mit herkömmlichen Transmittern sind größtenteils unbekannt. Immuncytochemisch konnten sowohl Glucagon als auch Enkephalin in Amakrinzellen der Vogelretina (Katayama-Kumoi et al. 1985; Watt et al. 1985) und Neurotensin in Amakrinzellen der Schildkrötenretina (Weiler und Ball 1984) nachgewiesen werden.

Viele verschiedene Peptide sind auch in Insekten schon immuncytochemisch festgestellt worden (Truman und Taghert 1983), darunter auch Glucagon und Enkephalin. In immuncytochemischen Untersuchungen von *Drosophila melanogaster* auf Enkephalin, konnten Leu-Enkephalin-positive Färbungen in der Lobula festgestellt werden (Jan und Jan 1982). Met-Enkephalin konnte in *Drosophila* zwar im Gehirn, jedoch nicht in den optischen Loben festgestellt werden (Pages et al. 1983). Neurotensin-positive Färbungen in Insekten sind nicht bekannt. In den angeführten Untersuchungen wurden Antikörper verwendet die gegen Neuropeptide von Säugern gerichtet waren. Augen von 2 Fliegen die mit dem Neurotensin Antikörper inkubiert worden waren, zeigten keine immuncytochemischen spezifischen neuronalen Färbungen in den optischen Loben. Sowohl der Antikörper gegen Met-Enkephalin als auch der

gegen Glucagon lieferten in der Fleischfliege in je 2 Fliegen spezifische Färbungen. 3 weitere Versuche mit dem Glucagon Antikörper, sowie 2 weitere mit dem Met-Enkephalin Antikörper lieferten keine Färbungen mehr. Obwohl diese große Differenz erst durch weitere Versuche abgeklärt werden muß, sollen die Färbungen der beiden Antikörper kurz vorgestellt werden.

Der Glucagon Antikörper färbte Zellkörper im Chiasma von der proximalen Laminagrenze bis zu 80 μm dahinter. In diesem Bereich liegen Amakrinzellkörper (Strausfeld 1971) und die Zellkörper marginaler Gliazellen (Saint Marie und Carlson 1983).

Der Met-Enkephalin Antikörper färbte wenige Zellkörper, die alle etwa 100 μm von der proximalen Laminagrenze entfernt lagen. Außerdem waren in einigen Schnitten durch die Lamina laufende Fasern zu beobachten die an deren distaler Grenze eine Verzweigung aufwiesen, wobei dann der weitere Faserverlauf parallel zur Laminagrenze war.

4. DISKUSSION

4.1 Cholinerge Zellen

Die Immuncytochemie mit dem Acetylcholin (ACh) Antikörper zeigte in 11 Fliegen eine reproduzierbare Färbung der Photorezeptorendigungen R1-R6 in der Lamina ganglionaris. Diese R1-R6 Terminals konnten in Längsschnitten in ihrem Verlauf von der Retina bis zur proximalen Grenze der Lamina mit dem typischen gegenseitigen Überkreuzen der Fasern in der "nuclear layer" gezeigt werden (Abb.5A). In Schnitten senkrecht zur Cartridgeachse konnte die aus 6 R1-R6 Axonen bestehende Rezeptorkrone mit Anti-ACh gefärbt werden (Abb. 5B).

Die weniger reproduzierbare Färbung der anderen optischen Loben wird wahrscheinlich durch die Zerstörung von Fasern mit kleinem Durchmesser verursacht, ein Umstand der wohl auf einen Fehler bei der Histologie zurückzuführen ist.

Die Ansicht, daß die an der Biosynthese von ACh beteiligten Enzyme, wie die Cholin Acetyltransferase (ChAT) und die Acetyl CoA Synthetase, im Cytoplasma cholinergischer Nervenendigungen lokalisiert sind (Israël und Manarche 1985) ist allgemein anerkannt. Deshalb wird ACh auch hauptsächlich in diesen Endigungen synthetisiert (Hebb 1972). Die Färbungen der Photorezeptorendigungen R1-R6 mit Anti-ACh scheinen diese Lokalisation des Hauptbiosyntheseortes wiederzuspiegeln.

Mit der Histochemie der Acetylcholinesterase (AChE)

konnten Zellkörper in der "nuclear layer" gefärbt werden. Quergeschnittene Cartridges der Lamina zeigten mit der AChE-Histochemie Färbungen axonaler Strukturen in ihrer Zentralachse , die als der laminäre Teil der Monopolaren L1-L2 zu betrachten sind (Abb.6). Autoradiographische und histochemische Studien haben gezeigt, daß AChE hauptsächlich an der postsynaptischen Membran zu finden ist (Lund 1985). Diese hauptsächlich postsynaptische AChE Lokalisation scheint sich in der AChE Färbung der Monopolaren L1-L2 niederzuschlagen.

Man nimmt an, daß ACh durch spezifische AChE und nichtspezifische Cholinesterasen (ChE) , wie z. B. Butyrylcholin Esterase (BuChE), hydrolysiert wird. In einem geringen Anteil kann diese Hydrolyse auch durch aromatische (ari-) bzw. aliphatische (ali-) Esterasen erfolgen. Die Aktivität von AChE und ChE kann dabei durch Eserin gehemmt werden (Klemm 1976), wohingegen die Hydrolyse von ACh durch ali-Esterasen nicht beeinträchtigt wird. Das Fehlen jeglicher ChE Aktivität, auch der von BuChE, und auch der Aktivität von ari-Esterasen wurde im Gehirn der Schabe beobachtet (Frontali et al. 1971). Auch andere Untersuchungen sprechen gegen eine BuChE Aktivität in Insekten (Colhoun 1963; Hess 1972; Lund 1985).

Deshalb erscheint es angebracht die Färbungen durch die AChE Histochemie in der Fleischfliege , die eindeutig durch Eserin unterbunden werden (Abb.7), der Aktivität einer spezifischen Acetylcholin Esterase zuzuordnen.

Untersuchungen zur AChE Verteilung in den optischen Loben verschiedener Insektenarten zeigte in allen untersuchten Arten AChE Aktivität in Medulla und Lobula. Unterschiede der Verteilung konnten jedoch in der Lamina beobachtet werden. In der Lamina der Schabe sowie der Lamina einer Hymenopterenart konnte keine AChE Aktivität nachgewiesen werden, wohingegen die Lamina einer Grille als auch der Stubenfliege *Musca domestica* AChE Aktivität zeigte (Klemm 1976). Greenspan (1980) wies AChE Aktivität in der Lamina der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* nach. Dahingegen konnte eine kürzlich publizierte Untersuchung (Buchner et al. 1986) keine AChE Aktivität in der Lamina von *Drosophila* feststellen. In der gleichen Arbeit wurde auch die Verteilung von Cholin Acetyl Transferase immunocytochemisch untersucht. Die cholinergen Strukturen die in der Lamina gefärbt waren wurden jedoch von den Autoren als mögliche Strukturen von C2 Zellen interpretiert. Die Superfusion mit Acetylcholin (10^{-3} M), dem Transmitterkandidaten der Photorezeptoren R1-R6, verursachte eine langanhaltende negative Verschiebung des Ruhepotentials der Monopolaren L1-L2 (Abb9). Diese Hyperpolarisation des Ruhepotentials weist auf die vermutete agonistische Wirkung von ACh hin.

Die Anticholinesterase Eserin hemmt den Abbau des präsynaptisch ausgeschütteten ACh und bewirkt damit eine Erhöhung der ACh-Konzentration. Deshalb sollte die Eserinapplikation ähnliche Veränderungen der Monopolarenantwort hervorrufen wie ACh. Intrazellulär abgeleitete

Monopolarenantworten zeigten unter Eserineinwirkung jedoch ein anderes Verhalten als unter ACh-Einwirkung. Eserin verringerte die Amplitude der On-Antwort es zeigte sich jedoch nur eine sehr geringe Hyperpolarisation des Ruhepotentials (Abb.10). Ableitungen der Photorezeptoren R1-R6 unter Eserineinwirkung zeigten aber auch eine Verminderung der depolarisierenden Lichtantwort, die durch Waschen mit Ringerlösung wieder aufgehoben werden konnte (Abb.11). Das zeigt eine spezifische Wirkung von Eserin auf die Photorezeptoren R1-R6 an. Diese Wirkung scheint auch die Veränderungen der postsynaptischen Monopolarenantwort zu bedingen, obwohl eine mögliche postsynaptische antagonistische Eserinwirkung (Sattelle 1985) nicht ausgeschlossen werden kann.

Timpe und Stuart (1985) zeigten, daß Eserin eine ACh induzierte Depolarisation im Photorezeptor der Entenmuschel verringerte. Um die beobachteten Eserinwirkungen auf die Photorezeptoren R1-R6 von *Calliphora* aufzuklären und auch um möglicherweise den Wirkort von Eserin in diesem Fall näher zu bestimmen, müssen jedoch weitere eingehendere Untersuchungen erfolgen.

Weitere Versuche müssen auch durchgeführt werden um die beobachtete Wirkung des Reuptake Hemmers von Cholin, Hemicholinum 3, auf das Monopolarenpotential zu bestätigen.

ACh hatte keinen Einfluß auf das Potential der Photorezeptoren, ebenso zeigte keiner der angewendeten Antagonisten eine Auswirkung auf die Lichtantwort der

Photorezeptoren.

Die Veränderungen der Monopolarenantwort durch die Badapplikation von ACh-Rezeptor-Antagonisten waren in großem Ausmaß reproduzierbar. Mehrere Experimente mit Curare als auch mit Decamethonium (DECA) zeigten, daß beide Antagonisten in der Lage waren die licht-induzierten Monopolarenantworten vollkommen zu unterdrücken. Eine totale Blockierung der Monopolarenantwort konnte auch durch die Applikation von Hexamethonium erzielt werden. Obwohl badappliziertes Curare und DECA eine Blockierung der Lichtantwort von Monopolaren zur Folge hatten, zeigten sich im zeitlichen Auftreten der Veränderungen Differenzen. Die Reduktion der On- als auch der Off-Antwort erscheint bei Curare gleichzeitig (Abb.13,14). Das Ruhepotential wird unter Curare immer in positive Richtung verschoben. DECA verringert zuerst die Off-Antwort und dann erst die On-Antwort (Abb.12). Das Ruhepotential weist unter DECA eine kleine aber negative Verschiebung auf. Von beiden Antagonisten liegen Untersuchungen aus Vertebraten vor die nachweisen, daß sowohl Curare als auch DECA in der Lage sind zusätzlich zu ihrer antagonistischen Wirkung am ACh Rezeptor auch noch an die ACh Ionophore zu binden und somit als Kanalblocker zu wirken (Colquhoun et al. 1979; Adams und Sakmann 1978). Untersuchungen in *Aplysia* zeigten, daß Curare als Kanalblocker sowohl von Natrium- als auch von Chloridleitfähigkeiten wirken kann (Carpenter et al. 1977). Eine Unterscheidung welche Bindung der einzelne

Antagonist in der Fleischfliege eingegangen ist, ist mit den hier verwendeten Methoden nicht möglich. Man kann jedoch die beobachteten Unterschiede in der Wirkung von Curare und DECA auf die Monopolarenantwort auf eine mögliche, unterschiedliche Bindung zurückführen.

Die Antwort der Monopolaren wurde von α -Bungarotoxin (α -BGTX) auch in Konzentrationen von bis zu $1,6 \times 10^{-5}$ M nicht beeinträchtigt (Abb.15). In autoradiographischen Untersuchungen wurde in der Lamina von *Drosophila melanogaster* keine Bindung von [125 I] α -BGTX beobachtet (Schmidt-Nielsen et al. 1977; Rudloff 1978). Auch Atropin zeigte in *Calliphora erythrocephala* keinen Einfluß auf das Potential von L1-L2. Aus den beobachteten Wirkungen der einzelnen verwendeten Antagonisten ist es möglich eine erste Einordnung des ACh Rezeptors der Monopolaren L1-L2 vorzunehmen.

Drei verschiedene putative cholinerge Rezeptortypen sind durch biochemische Bindungsstudien im Nervengewebe von Dipteren festgestellt worden (Harrow et al. 1982):

- die α -Bungarotoxin (α -BGTX) bindende Komponente mit den Eigenschaften eines nicotinergen Rezeptors (Dudai 1977; Schmidt-Nielsen et al. 1977; Dudai 1980; Eldefrawi und Eldefrawi 1980; Rudloff et al. 1980; Jones et al. 1981)
- die Quinuclidinyl benzilat (QNB) bindende Komponente mit den Eigenschaften eines muscarinergen Rezeptors (Dudai und Ben-Barak 1977; Jones und Sumikawa 1981)
- die Decamethonium (DECA) bindende Komponente mit

gemischten pharmakologischen Eigenschaften

(Donnellan et al. 1975; Mansour et al. 1977)

Sowohl die QNB bindende als auch die DECA bindende Komponente binden wenig oder kein α -BGTX (Dudai and Ben-Barak 1977; Mansour et al. 1977). Die QNB bindende Komponente weist eine große Affinität zu Atropin auf, aber die Affinität zu DECA ist klein (Dudai und Ben-Barak 1977). Die DECA bindende Komponente zeigt in etwa die gleiche Affinität zu Curare wie zu Atropin und eine große Affinität zu DECA (Mansour et al. 1977). Die Insensitivität gegenüber α -BGTX wie auch gegenüber Atropin und die große Empfindlichkeit gegenüber DECA ergeben die größte Übereinstimmung mit dem beschriebenen decamethonergen ACh Rezeptor, obwohl die Möglichkeit eines anderen Rezeptortyps nicht ausgeschlossen werden kann.

Im Metathorakalganglion der Schabe *Periplaneta americana* wurde ein anderer nicotinerger, aber gegenüber α -BGTX fast insensitiver Rezeptor auf den Zellkörpern des DUM (dorsal unpaired median)-Neurons beschrieben (Harrow et al. 1982). Atropin zeigte an diesem Rezeptortyp keine physiologische Wirkung. Obwohl dieser Rezeptortyp ein ähnliches pharmakologisches Profil aufweist wie der putative ACh Rezeptor der Monopolaren, gibt es doch zwei Gründe die gegen diesen Typ sprechen. Zum ersten ist der Rezeptor in der Schabe extrasynaptisch. Der zweite und wohl wichtigere Grund betrifft die ACh Ionophore. Die DUM-Zellen und alle bisher elektrophysiologisch

untersuchten cholinergen Zellen in Insekten zeigen als Reaktion auf ACh eine depolarisierende Antwort (Sattelle 1985). Der Ersatz von Natriumionen durch Cholin in der Badlösung unterband den, sonst als Antwort auf ACh erhaltenen, Einwärtsstrom in das "fast coxal depressor" Motorneuron der Schabe (Harrow et al. 1982).

In *Calliphora erythrocephala* wurde nachgewiesen, daß die schnelle hyperpolarisierende On-Antwort der Monopolaren durch eine Leitfähigkeitserhöhung für Chloridionen bedingt ist (Zettler und Straka, unveröffentlichte Ergebnisse). Natriumleitfähigkeiten oder auch die Leitfähigkeiten für andere Kationen scheinen sehr häufig mit α -BGTX sensitiven Rezeptortypen assoziiert zu sein. Deshalb scheint es angemessen die Chlorid-Leitfähigkeit der Monopolaren mit einem anderen ACh Rezeptortyp zu verknüpfen, einem α -BGTX insensitiven decamethonergen Rezeptor.

Die durchgeführten intrazellulären Ableitungen von Monopolarzellen zeigten deutlich, daß deren Antworten von einigen cholinergen Antagonisten stark beeinflusst wurden. ACh wurde immunocytochemisch in den zu L1-L2 präsynaptischen Photorezeptoren R1-R6 nachgewiesen. Durch histochemische Untersuchungen war eine Zuordnung der AChE Aktivität in der Lamina zu Monopolarzellen möglich. Diese Untersuchungen machen es wahrscheinlich, daß ACh als Transmitter der Photorezeptoren R1-R6 auf die Monopolaren L1-L2 wirkt. Obwohl viele Anhaltspunkte vorliegen, daß der ACh Rezeptor der Monopolaren dem deca-

methonergen Rezeptortyp zugeordnet werden muß sind andere Möglichkeiten nicht auszuschließen.

4.2 GABAerge Zellen

Durch die Immuncytochemie mit einem Antikörper gegen γ -Aminobuttersäure (GABA) und 2 verschiedenen Antikörpern gegen das GABA synthetisierende Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD) konnten 2 unterschiedliche Fasersysteme in der Retina und Lamina von *Calliphora* gefärbt werden. Das eine Fasersystem repräsentierte die langen Photorezeptoren R7/8 während das andere durch die efferenten C2 Fasern, die die Medulla mit der Lamina verbinden (Strausfeld 1971), dargestellt wurde. Eine Identifikation der GABAergen Neurone konnte durch den Vergleich ihrer, durch die Immuncytochemie gefärbten, Strukturen mit Golgigefärbten klassifizierten Neuronen (Strausfeld 1976; Strausfeld und Nässel 1981) erzielt werden.

Die Photorezeptoren R7/8 wurden aufgrund folgender Kriterien identifiziert.

1. Fasern ziehen aus der Retina kommend durch die Lamina ins Chiasma (Abb.18).
2. Querschnitte durch Ommatidien der Retina zeigten dort eine GABAerge Färbung wo die Photorezeptoren R7 bzw. R7 und R8 erwartet werden (Abb.21,22).
3. Sowohl die Zellkörper von R7 im distalen als auch die Zellkörper von R8 im proximalen Teil der Retina zeigten

eine GABAerge Färbung (Abb.19,20).

Der GABAgehalt der Photorezeptoren R7/8 konnte durch Dunkeladaptation und der Inkubation in GABA bei gleichzeitiger Blockierung der GABA-Transaminase durch Gabaculin erhöht werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Auffassung, daß die langen Photorezeptoren R7/8 als GABAerge Neurone ihren Transmitter während der licht-induzierten Depolarisation freisetzen (Iversen 1971). Mit Fixativ A war eine zahlenmäßig häufigere GABAerge Färbung der Photorezeptoren R7 gegenüber R8 zu beobachten. Die Immuncytochemie mit Anti-GABA nach Fixierung mit Fixativ B färbte jedoch R7 und R8 im gleichen Maß. Obwohl gefärbte R7/8 Zellen in allen Bereichen der Retina gefunden wurden ist eine Entscheidung darüber, ob alle R7/8 Photorezeptoren oder nur Subpopulationen (Smola und Meffert 1979; Hardie 1979) GABAerg sind, aufgrund der nicht immer vollständigen Färbungen, nicht möglich. Ebenso wenig läßt sich die Frage entscheiden ob das Fehlen einer R8 Färbung mit Anti-GAD, bzw. die insgesamt geringere Färbehäufigkeit von R8 mit Anti-GABA durch physiologische Unterschiede zu R7 bedingt ist, oder nur die Folge einer unvollständigen Färbung ist.

Die C2 Zellen wurden nach folgenden Kriterien identifiziert.

1.Die C2 Faser endet im distalen Bereich der Lamina mit 2, meist 3 hakenförmigen Strukturen mit knopfartigen Verdickungen (Abb.25).

2. Es besteht ein Verhältnis von 1:1 zwischen C2 Fasern und Cartridges (Abb.23,24).

3. Die C2 Zellkörper sind hinter der proximalen Medullagrenze gelegen (Abb.26,27,28)

Die C2 Zellen sind die einzigen efferenten Fasern die eindeutig als präsynaptisch zu den Monopolaren L1,L2 und L3 beschrieben werden (Strausfeld und Nässel 1981; Trujillo-Cenoz 1985). Auch in *Musca domestica* konnten mit monoklonalen Antikörpern gegen GABA die C2 Zellen als GABAerge Zellen bestimmt werden (Meyer et al. 1986).

Mit der GABA Immuncytochemie konnte weder GABAerge epitheliale noch marginale Gliazellen in der Lamina von *Calliphora* nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu einer Uptake-Studie zur Aufnahme von radioaktiv markiertem GABA (Campos-Ortega 1973), die GABA in den epithelialen und marginalen Gliazellen lokalisierte. Dieser Widerspruch ist jedoch auf die vollkommen unterschiedlichen methodischen Ansätze zurückzuführen. Die Uptake-Studie geht davon aus ,daß die Inaktivierung von GABA an der Synapse durch einen präsynaptischen Uptake-Mechanismus für GABA erfolgt (Iversen 1971). Es wurde jedoch gezeigt, daß GABA auch von postsynaptischen Zellen und Gliazellen aufgenommen werden kann (Iversen et al. 1975). Die zelluläre Aufnahme von GABA als Hinweis auf GABAerge Zellen zu benutzen ist zudem durch Uptake-Studien in zwei, erst vor kurzem erschienenen, Publikationen in Frage gestellt worden (Zucker et al. 1984; Yazulla et al. 1986). Die

immuncytochemische Lokalisation von GAD (Oertel et al. 1984) wie auch die immuncytochemische Lokalisation von GABA müssen deshalb als zuverlässigere Methode zur Identifikation GABAerger Zellen angesehen werden.

Eine physiologische Funktion der C2 Zellen wurde durch intrazelluläre Ableitungen von Monopolaren unter Beeinflussung der GABAergen Transmission untersucht.

Intrazellulär abgeleitete, lichtinduzierte Monopolaren-potentiale zeigten unter Pikrotoxineinwirkung (PTX) (10^{-9} M) klar die Eliminierung der, auf Licht-Ausfolgenden, depolarisierenden Off-Antwort (Abb. 29, 30).

Keine Auswirkung auf die Antwort der Monopolaren zeigte die Applikation von Bicucullin Methjodid als auch von Imipramin.

Die I-Zellen der Entenmuschel, die ebenso wie die Monopolaren der Fleischfliege postsynaptisch zu Photorezeptoren sind und eine den Monopolaren vergleichbare Lichtantwort zeigen, zeigten unter PTX ebenfalls eine Eliminierung der Off-Antwort (Timpe und Stuart 1984).

Obwohl GABA als ein wichtiger interneuronaler Transmitter der Ganglien von Insekten angesehen wird (Klemm 1976), existieren nur wenige Untersuchungen über die Wirkungen von GABA an neuronalen GABA-Rezeptoren.

Elektrophysiologische Untersuchungen von GABA-Wirkungen erfolgten hauptsächlich an Nerv-Muskelpräparaten (Nistri und Constanti 1979). Durch elektrophysiologische Untersuchungen im Thorakalganglion von *Schistocera nitens* (Goodman und Spitzer 1979) wurden neuronale, muscimolsen-

sitive GABA-Rezeptoren, die durch Pikrotoxin geblockt werden, nachgewiesen. Erste Bindungsstudien von GABA mit Nervengewebe von Insekten zeigten, daß Bicucullin nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß in der Lage war rezeptorgebundenes GABA bzw. Muscimol aus ihren Bindungen zu verdrängen (Breer und Heiligenberg 1985; Lunt et al. 1985). Auch elektrophysiologische Untersuchungen neuromuskulärer Präparate von Crustaceen wiesen nach, daß die antagonistische Potenz von Bicucullin relativ zur Potenz von Pikrotoxin nur bei 1/50 bis 1/400 derselben lag (Nistri und Constanti 1979). Alle vorliegenden Untersuchungen deuten jedoch an, daß sich der GABA-Rezeptor der Invertebraten sowohl von den GABA_A als auch von den GABA_B Rezeptoren der Vertebraten unterscheidet (Simmonds 1983).

GABA wird aber sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten im allgemeinen eine inhibitorische Transmitterwirkung zugeschrieben (Nistri und Constanti 1979). Es sind jedoch elektrophysiologische Untersuchungen aus Vertebraten bekannt, in denen eine depolarisierende Wirkung von GABA zu beobachten ist (Gallagher et al. 1978; Hankins und Ruddock 1984). Untersuchungen an Neuronen im Gehirn der Schnecke *Helix* wiesen auf einen exzitatorischen GABA-Rezeptor hin (Walker et al. 1971). Yarowski und Carpenter (1977, 1978) unterschieden in *Aplysia* 5 verschiedene, durch GABA hervorgerufene, Antworten. Vier dieser Antworten waren exzitatorisch. Bisher wurden jedoch die, diese exzitatorischen Antworten

vermittelnden, Ionenpermeabilitäten nicht eindeutig bestimmt.

Die zu den Monopolaren präsynaptische C2 Zelle konnte mittels der Immuncytochemie mit Anti-GABA und Anti-GAD eindeutig als GABAerg identifiziert werden. Die Wirkung des GABA Antagonisten PTX - die Eliminierung der Off-Antwort der Monopolaren L1-L2 - zeigt an, daß diese Off-Antwort über die C2 Zelle vermittelt wird. Da mit den ACh Antagonisten Curare und Decamethonium Off- und On-Antwort von L1-L2 unterdrückt wurden, ist als sensorischer Eingang der, über die C2-Zelle vermittelten, Off-Antwort der Monopolaren der cholinerge Typ des Photorezeptors R1-R6 anzusehen. Hierbei erscheint der Verschaltungsweg $R1-R6 \rightarrow L1-L2-L3 \rightarrow C2 \rightarrow L1-L2-L3$ naheliegend. Andere Verschaltungsmöglichkeiten können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.3 Dopaminerge Zellen

Die Immuncytochemie mit Anti-Dopamin färbte reproduzierbar spezifische Strukturen in Retina und Lamina von *Calliphora*. Durch ihr morphologisches Erscheinungsbild und ihre Lage konnten diese Strukturen im Vergleich mit Golbigefärbten Neuronen (Strausfeld 1971,1976) eindeutig als lange Photorezeptoren R7/8 und als Monopolaren L1-L2 identifiziert werden.

Die Identifizierung der Photorezeptoren R7/8 erfolgte

nach folgenden Kriterien.

1. Querschnitte von Ommatidien der distalen Retina zeigten dort dopaminerge Strukturen, wo der Photorezeptor R7 lokalisiert wurde (Abb.36B).

2. Querschnitte von Ommatidien der proximalen Retina zeigten in der Position von R8 (Dietrich 1909) dopaminerge Strukturen. Außerdem wurde in diese Ommatidien eine zweite gefärbte axonale Struktur festgestellt. Im proximalen Bereich der Retina verläuft als einziges Axon das des Photorezeptors R7 (Abb.37B).

3. In Längsschnitten der Retina konnte in deren proximalem Bereich die Zellkörper von R8 lokalisiert werden (Abb.34).

4. Querschnitte der Lamina zeigten an der Stelle des Durchzugs von R7/8 klar mit Anti-Dopamin gefärbte axonale Strukturen (Abb.35).

Da in Quer- oder Tangentialschnitten eine fast vollständige Färbung der R7 und R8 Photorezeptoren zu erkennen war kann angenommen werden , daß alle R7/8 Photorezeptoren Dopamin enthalten (Abb.31,33).

Die Identifizierung der Monopolaren L1-L2 wurde nach folgenden Kriterien vorgenommen.

1. In der "nuclear layer" waren Zellkörper mit dem Dopamin-Antikörper gefärbt (Abb.31,34). Die "nuclear layer" enthält nur die Zellkörper der Monopolaren (Strausfeld 1971).

2. Querschnitte der Lamina zeigten in der Mitte jeder einzelnen Cartridge 2 gefärbte Strukturen (Abb.35). Diese

2 dopaminergen Strukturen konnten sowohl im distalen als auch im proximalen Bereich der Lamina beobachtet werden. Nur die Monopolaren L1-L2 liegen durch die gesamte Länge der Lamina hindurch in der Mitte der Cartridge (Boschek 1971).

Frühere Untersuchungen mit der Falck-Hillarp Methode konnten in der Lamina von *Calliphora vomitoria* keine monoaminergen Zellen feststellen (Eloffson und Klemm 1972). Die immunocytochemische Identifikation eines serotonergen Zelltyps in der Lamina von *Calliphora erythrocephala* (Nässel et al. 1983) gibt einen ersten Hinweis auf die größere Empfindlichkeit der immunocytochemischen Methode. Auch in *Schistocera* enthüllt die Immunocytochemie Strukturen (Nässel und Klemm 1983), die in einer früheren Untersuchung (Eloffson und Klemm 1972) keine Färbung aufwiesen.

Die R7/8 Photorezeptoren, oder zumindest eine Subpopulation von R7/8, war bereits immunocytochemisch als GABAerg identifiziert worden. Zur Abklärung einer möglichen falschen positiven dopaminergen Färbung bzw. einer falschen positiven GABAergen Färbung wurden zusätzlich zur Präabsorption mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper weitere Kontrollexperimente durchgeführt. Die spezifischen Färbungen, sowohl von Anti-Dopamin als auch von Anti-GABA, wurden durch die Präabsorption mit dem Glutaraldehyd-Konjugat des Trägerproteins nicht beeinträchtigt. Daraus kann geschlossen werden, daß der Antikörper nicht an einen

Antigenwirkort bindet, der sich am Trägerprotein befindet. Die unveränderte spezifische dopaminerge Färbung nach Präabsorption des Dopamin-Antikörpers mit dem GABA-Konjugat bzw. die unveränderte GABAerge Färbung nach Präabsorption des GABA-Antikörpers mit dem Dopamin-Konjugat weisen auf die Spezifität des GABA- bzw. des Dopamin-Antikörpers hin.

Zur weiteren Absicherung des Befundes dopaminerger R7/8 Photorezeptoren wurde die Zerstörung dopaminerger Zellen durch 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) angewandt. Die Aufnahme von 6-OHDA in dopaminerge Zellen ist gesichert, die genaue Wirkungsweise jedoch nicht (Sachs und Jonsson 1975). Die cytotoxische Wirkung von 6-OHDA ist in Vertebraten belegt (Reynolds und Perez-Polo 1981; Negishi et al. 1982).

In der Fleischfliege zeigte die Immuncytochemie mit Anti-Dopamin zu unterschiedlichen Zeiten nach 6-OHDA Injektion klar die Zerstörung der langen Photorezeptoren, und lieferte somit einen weiteren Hinweis auf die Existenz von Dopamin in den Photorezeptoren R7/8 (Abb.36,37).

Die Verknüpfung der Ergebnisse der Dopamin Immuncytochemie mit denen der GABA Immuncytochemie lassen den Schluß zu, daß zumindest eine Subpopulation der Photorezeptoren R7/8 sowohl GABA als auch Dopamin enthalten.

Die Koexistenz verschiedener Transmittersubstanzen im gleichen Neuron ist bekannt (Bradford 1986). Meist handelt es sich hierbei jedoch um die Koexistenz eines

Neuropeptids mit einer klassischen Transmittersubstanz. Untersuchungen im Gehirn der Ratte belegten jedoch die Koexistenz von GABA und Serotonin in Raphe Neuronen (Pujol 1984). Die Koexistenz von 4 neuroaktiven Substanzen, nämlich die der synthetisierenden Enzyme von ACh, Taurin, GABA und eines Katecholamins, wurde in den Nervenendigungen einzelner Motorneurone des menschlichen Muskels gezeigt (Chan-Palay und Palay 1984).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Komplexauge von *Calliphora erythrocephala* wurden durch immuncytochemische und histochemische Verfahren Transmittersubstanzen bzw. metabolische Enzyme des einzelnen Transmitters lokalisiert.

Die Immuncytochemie mit einem gegen Acetylcholin gerichteten Antikörper zeigte, daß die Nervenendigungen der Photorezeptoren R1-R6 Acetylcholin enthalten. Durch histochemische Untersuchungen wurde eine spezifische eserinsensitive Acetylcholinesterase (AChE) in den optischen Loben der Fleischfliege lokalisiert. In der Lamina ganglionaris konnte die AChE Aktivität den, zu den Photorezeptoren postsynaptischen, Monopolaren L1-L2 zugeordnet werden.

Intrazelluläre Ableitungen von den Photorezeptoren R1-R6 als auch von den Monopolaren L1-L2 unter neuropharmakologischer Beeinflussung der cholinergen Transmission erbrachte folgende Ergebnisse:

Badappliziertes ACh hyperpolarisierte das Ruhepotential der Monopolaren. ACh hatte keinen Einfluß auf die Photorezeptorenantwort. Eserin verursachte jedoch bereits beim Photorezeptor eine Abnahme der depolarisierenden Antwort. Die beobachtete Abnahme des hyperpolarisierenden Monopolarenpotentials kann somit sowohl als Folge der Eserinwirkung auf Photorezeptoren als auch einer möglichen Wirkung auf postsynaptischen ACh-Rezeptoren zugeschrieben werden. ACh-Rezeptoren

Antagonisten zeigten keinen Einfluß auf die Antwort der Photorezeptoren R1-R6. Die Antagonisten Curare, Decamethonium und Hexamethonium blockierten die Lichtantwort der Monopolaren vollständig. α -Bungarotoxin, bekannt als potenter irreversibler Antagonist an vielen nicotinergen Rezeptoren bei Vertebraten, hatte keine Auswirkung auf das Monopolarenpotential. Das als Antagonist des muscarinergen Rezeptors bekannte Atropin war ebenfalls ohne Wirkung. Ein Hemmer des Cholin-reuptake, Hemicholinum 3, zeigte Wirkungen auf das Monopolarenpotential. Strychnin, ein Antagonist einer ACh vermittelten Hyperpolarisation in *Aplysia*, zeigte keine Wirkung auf das Monopolarenpotential von *Calliphora*.

Die Wirkungen der verwendeten Antagonisten erlaubten eine erste Einordnung des ACh Rezeptors der Monopolaren L1-L2. Dieser Rezeptortyp weist eine große Ähnlichkeit mit dem in Dipteren durch Bindungsstudien charakterisierten decamethonergen ACh Rezeptortyp auf.

Mit 2 verschiedenen Antikörpern gegen Glutamatdecarboxylase (GAD) und einem direkt gegen γ -Aminobuttersäure (GABA) gerichteten Antikörper wurden GABAerge Strukturen in Retina und Lamina nachgewiesen. Der GABA-Gehalt putativer GABAerger Zellen konnte durch Dunkeladaptation und durch Inkubation in GABA bei gleichzeitiger Blockierung der GABA-Transaminase mit Gabaculin erhöht werden.

Die langen Photorezeptoren R7 und R8, die in die Medulla projizieren, zeigten eine GABAerge Färbung. Die Identifi-

kation von R7/8 erfolgte aufgrund ihrer Anordnung in quergeschnittenen Ommatidien der Retina und der, in Längsschnitten sichtbaren, Lage ihrer Zellkörper.

Die efferenten C2 Fasern, die an der distalen Laminagrenze mit hakenförmigen Strukturen enden und ihren Ursprung in einem, hinter der proximalen Grenze der Medulla gelegenen, Zellkörper haben, zeigten ebenfalls eine GABAerge Färbung.

Eine Blockierung der GABAergen Transmission von den C2 Fasern auf die postsynaptischen Monopolaren L1-L2 wurde durch die Applikation von Pikrotoxin (PTX), Bicucullin Methjodid (BM) und Imipramin versucht.

Intrazelluläre Ableitungen von Monopolaren unter PTX zeigten ein Verschwinden der depolarisierenden Off-Antwort. BM übte keinen Einfluß auf das postsynaptische Potential aus. Imipramin, ein Pharmaka mit großer Bindungsaffinität zu GABA Rezeptoren in Locusta, hatte ebenfalls keine Wirkung auf das Monopolarenpotential.

Die Veränderung der Lichtantwort der Monopolaren L1-L2 durch cholinerge Antagonisten einerseits und GABAerge Antagonisten andererseits läßt erkennen, daß das postsynaptische Potential der Monopolaren von zwei verschiedenen synaptischen Eingängen gesteuert wird. Die hyperpolarisierende On-Antwort wird über den cholinergen Eingang der Photorezeptoren R1-R6 vermittelt, wohingegen die Off-Antwort über den GABAergen Eingang der C2 Zellen vermittelt wird.

Die Immuncytochemie mit Anti-Dopamin färbte 2 unter-

schiedliche Zelltypen im Komplexauge von *Calliphora*.

Alle R7/8 Photorezeptoren wurden mit dem Dopamin Antikörper gefärbt. Die Unterscheidung von R1-R6 Photorezeptoren konnte in Querschnitten der Lamina durchgeführt werden. Die Monopolaren L1-L2 konnten aufgrund der Färbung ihrer Zellkörper in der "nuclear layer" und der Lage ihrer axonalen Strukturen in quergeschnittenen Cartridges identifiziert werden.

Durch zusätzliche Präabsorptionsexperimente wurde sowohl die Spezifität der GABAergen R7/8 Färbung als auch der dopaminergen R7/8 Färbung bestätigt. Die Zerstörung von R7/8 nach der Injektion von 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) war ein weiterer Hinweis auf die Existenz von Dopamin in den Photorezeptoren R7/8.

6. LITERATUR

- Adams PR and Sakmann B (1978) Decamethonium both opens and blocks endplate channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2994-2998
- Akaike N, Hattori K, Oomura Y and Carpenter DO (1985) Bicuculline and picrotoxin block γ -aminobutyric acid-gated Cl-conductance by different mechanism. Experienta 41:70-71
- Ammermueller J and Weiler R (1985) S - neurons and not L-neurons are the source of GABAergic action in the ocellar retina. J.Comp. Physiol. 157:779-788
- Autrum H, Zettler F, Järvillehto M (1970) Postsynaptic potentials from a single monopolar neuron of the Ganglion Opticum I of the blowfly *Calliphora*. Z. vergl. Physiol. 70:414-424
- Barker DL, Herbert E, Hildebrand JG and Kravitz EA (1972) Acetylcholine and lobster sensory neurones. J. Physiol. 226:205-229
- Boistel J (1968) The synaptic transmission and related phenomena in insects. In: Beament JWL, Treherne JE and Wigglesworth VB (eds) Advances in Insect Physiology 5, Academic Press, London and New York, pp. 1-64
- Boschek CB (1971) On the fine structure of the peripheral retina and lamina ganglionaris of the fly *Musca domestica*. Z. Zellforsch. 118:369-409
- Bradford HF (1986) Chemical Neurobiology, Freeman WH and Company, New York

- Braitenberg V (1967) Patterns of projection in the visual system of the fly. I. Retina-lamina projections. Exp. Brain Res. 3:271-298
- Breer H (1981) Comparative studies on cholinergic activities in the central nervous system of *Locusta migratoria*. J. Comp. Physiol. 141:271-275
- Breer H and Heiligenberg H (1985) Neurochemistry of GABAergic activities in the central nervous system of *Locusta migratoria*. J. Comp. Physiol. 157:343-354
- Buchner E, Buchner S, Crawford G, Mason WT, Salvaterra PM, and Sattelle DB (1986) Choline acetyltransferase - like immunoreactivity in the brain of *Drosophila melanogaster* Cell Tissue Res. 246:57-62
- Burkhardt D, Autrum H (1960) Die Belichtungspotentiale einzelner Sehzellen von *Calliphora erythrocephala* Meig. Z. Naturforsch. 15b:612-616
- Burkhardt W and Braitenberg V (1976) Some peculiar synaptic complexes in the first visual ganglion of the fly *Musca domestica*. Cell Tissue Res. 173:287-308
- Cajal SR, Sánchez D (1915) Contribución al conocimiento de los centros nerviosos de los insectos. Trab. Lab. Invest. Biol. 13:1-168
- Callec JJ (1985) Synaptic transmission in the central nervous system. In: Kerkut GA, Gilbert I (eds) Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology vol 5, Pergamon Press Oxford New York Toronto Sydney Paris Frankfurt, pp. 139-179
- Campistron G, Buijs RM and Geffard M (1986a) Specific antibodies against aspartate and their immunocytochemical application in the rat brain. Brain Res. 365:179-184

Campistron G , Buijs RM and Geffard M (1986b) Glycine neurons in the brain and spinal cord . Antibody production and immunocytochemical localization. Brain Res. 376: 400-405

Campos-Ortega JA (1973) Autoradiographic localization of ³H- γ -aminobutyric acid uptake in the lamina ganglionaris of *Musca* and *Drosophila*. Z. Zellforsch. 147: 415-431

Campos-Ortega JA, Strausfeld NJ (1972) The columnar organization of the second synaptic region of the visual system of *Musca domestica* L.I.Receptor terminals in the medulla. Z. Zellforsch. 124:561-585

Carpenter DO, Swann JW, Yarowsky PJ (1977) Effect of curare on responses to different putative neurotransmitters in *Aplysia* neurons. J. Neurobiol. 8:119-132

Chan-Palay V and Palay SL (1984) Coexistence in Human and and Primate neuromuscular junctions of enzymes synthesizing four neuroactive substances:Acetylcholine, Catecholamine, Gamma Aminobutyric Acid, and Taurine. In: Chan-Palay V, Palay SL (eds) Coexistence of neuroactive substances in neurons. Wiley & Sons, New York Chichester Brisbane Toronto Signapore, pp. 141-159

Colhoun EH (1963) The physiological significance of acetylcholine in insects and observations upon other pharmacologically active substances. In: Beament JWL, Treherne JE and Wigglesworth VB (eds) Advances in Insect Physiology 1, Academic Press, London and New York pp. 1-45

Colquhoun D, Dreyer F, Sheridan RE (1979) The actions of tubocurarine at the frog neuromuscular junction. J. Physiol 293:247-284

- Datum KH, Weiler R, and Zettler F (1986) Immunocytochemical demonstration of γ - aminobutyric acid and glutamic acid decarboxylase in R 7 photoreceptors and C 2 centrifugal fibres in the blowfly visual system. *J. Comp. Physiol.* 159:241-249
- DeVoe RD (1985) The eye: Electrical activity. In: Kerkut GA, Gilbert I (eds) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* vol 6, Pergamon Press, Oxford New York Toronto Sydney Paris Frankfurt, pp. 277-354
- Dietrich W (1909) Die Facettenaugen der Dipteren. *Z. Wiss. Zool.* 92:465-539
- Donnellan JF, Jewess PJ and Cattell KJ (1975) Subcellular localization and properties of a cholinergic receptor isolated from housefly heads. *J. Neurochem.* 25:623-629
- Dudai Y (1977) Demonstration of an α -bungarotoxin-binding nicotinic receptor in flies. *FEBS Letter* 76:211-213
- Dudai Y (1980) Cholinergic receptors of *Drosophila*. In: Sattelle DB, Hall LM, and Hildebrand JG (eds) *Receptors for Neurotransmitters, Hormones and Pheromones in Insects*. Elsevier / North - Holland Biomedical Press, Amsterdam pp. 93-110
- Dudai Y and Ben-Barak J (1977) Muscarinic receptor in *Drosophila melanogaster* demonstrated by binding of [3 H] Quinuclidinyl benzilate. *FEBS Letter* 81:134-136
- Eldefrawi AT (1985) Acetylcholinesterases and Anticholinesterases. In: Kerkut GA, Gilbert I (eds) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* vol 11 Pergamon Press, Oxford New York Toronto Sydney Paris Frankfurt pp. 115-130

- Eldefrawi AT and Eldefrawi ME (1980) Putative acetylcholine receptors in housefly brain. In: Sattelle DB, Hall LM, and Hildebrand JG (eds) Receptors for Neurotransmitters, Hormones and Pheromones in Insects. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam pp.59-70
- Elofsson R, Klemm N (1972) Monoamine-containing neurons in the optic ganglia of crustaceans and insects. Z. Zellforsch. 133: 475-499
- Frontali N, Piazza R, and Scolopetti R (1971) Localization of acetylcholinesterase in the brain of *Periplaneta americana*. J. Insect Physiol. 17:1833-1842
- Gallagher JP, Higashi H, and Nishi S (1978) Characterization and ionic basis of GABA-induced depolarizations recorded in vitro from cat primary afferent neurones. J. Physiol. 275:263-282
- Geffard M, Buijs RM, Seguela P, Pool CW and Le Moal M (1984) First demonstration of highly specific and sensitive antibodies against dopamine. Brain Research 294:161-165
- Geffard M, Viellemaire J, Heinrich-Rock AM and Duris P (1985) Anti-acetylcholine antibodies and first immunocytochemical application in insect brain. Neuroscience Letters 57:1-6
- Goodman CS and Spitzer NC (1979) Embryonic development of identified neurones: differentiation from neuroblast to neurone. Nature 280:208-214
- Greenspan RJ (1980) Mutations of Choline acetyltransferase and associated neural defects in *Drosophila melanogaster*. J. Comp. Physiol. 137:83-92

- Greenspan RJ, Finn JA, and Hall JC (1980) Acetylcholinesterase mutants in *Drosophila* and their effects on the structure and function of central nervous system. *J.Comp. Neurol.* 189:741-774
- Hankins MW and Ruddock KH (1984) Electrophysiological effects of GABA on fish retinal horizontal cells are blocked by bicuculline but not by picrotoxin. *Neuroscience Letters* 44:1-6
- Hardie RC (1979) Electrophysiological analysis of fly retina.I: Comparative properties of R1-6 and R7 and R8. *J. Comp. Physiol.* 129:19-33
- Harrow ID, David JA and Sattelle DB (1982) Acetylcholine receptors of identified insect neurons. In: *Neuropharmacology of insects* (Ciba Foundation Symposium 88) Pitman, London pp. 12-31
- Hebb C (1972) Biosynthesis of Acetylcholine in nervous tissue. *Physiol. Review* 52:918-957
- Hess A (1972) Histochemical localization of cholinesterase in the brain of the cockroach (*Periplaneta americana*). *Brain Research* 46:287-295
- Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29:577-580
- Israël M and Manaranche R (1985) The release of acetylcholine: From a cellular towards a molecular mechanism. *Biol. Cell.* 55:1-14
- Iversen LL (1971) Role of transmitter uptake mechanism in synaptic neurotransmission. *Br.J. Pharmacol.* 41:571-591

- Iversen LL, Dick F, Kelly JS, Schon F (1975) Uptake and localization of neurotransmitter amino acids in the nervous system. In: Berl S, Clark DD, Schneider D (eds) Metabolic compartmentation and neurotransmission-relation to brain structures and functions. Plenum Press, New York pp. 65-99
- Jan YN and Jan LY (1982) Genetic and immunological studies of the nervous system of *Drosophila melanogaster*. In: Neuropharmacology of insects. (Ciba Foundation Symposium 88) Pitman, London pp. 221-239
- Järvilehto M and Zettler F (1971) Localized intracellular potentials from pre- and postsynaptic components in the external plexiform layer of an insect retina. *Z. vergl. Physiol.* 75:422-440
- Jones SW, Sumikawa K (1981) Quinuclidinyl benzilate binding in the housefly head and rat brain. *J. Neurochem.* 36:454-459
- Jones SW, Sudershan P and O'Brien RD (1981) α -Bungarotoxin binding in housefly heads and *Torpedo* electroplax. *J. Neurochem.* 36:447-453
- Karnovsky MJ, Roots L (1964) A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* 12:219-221
- Katayama - Kumoi Y, Kiyama H, Manabe R, Shiotani Y and Tohyama M (1984) Coexistence of glucagon- and substance P-like immunoreactivity in the chicken retina. *Neuroscience* 16:417-424
- Kehoe J (1972) Three acetylcholine receptors in *Aplysia* neurons. *J. Physiol.* 225:115-146

- Kirschfeld K (1967) Die Projektion der optischen Umwelt auf das Raster der Rhabdomere im Komplexauge von *Musca*. *Exp. Brain Res.* 3:248-270
- Kirschfeld K (1973) Das neurale Superpositionsauge. *Fortschr. d. Zool.* 21:229-257
- Klemm N (1976) Histochemistry of putative neurotransmitter substances in the insect brain. *Prog. Neurobiol.* 7:99-169
- Klemm N, Axelsson S (1973) Detection of dopamine, noradrenaline and 5-hydroxytryptamine in the cerebral ganglion of the desert locust *Schistocera gregaria* Forsk. *Brain Research* 57:289-298
- Klingman A and Chappell RL (1978) Feedback synaptic interaction in the dragonfly ocellar retina. *J. Gen. Physiol* 71:157-175
- Koike H (1983) Transmitter substance of Barnacle photoreceptor. In: Grinnell AD (ed) *The Physiology of Excitable Cells*. AR Liss, Inc. New York pp. 523-534
- Löscher W (1980) Comparative study of the inhibition of GABA aminotransferase by different anticonvulsant drugs. *Arch. int. Pharmacodyn.* 243:48-55
- Lund AE (1985) Insecticides: Effects on the nervous system. In: Kerkut GA, Gilbert I (eds) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* vol 11, Pergamon Press, Oxford New York Toronto Sydney Paris Frankfurt, pp. 9-56
- Lunt GG, Robinson TN, Miller T, Knowles WP and Olsen RW (1985) The identification of GABA receptor binding sites in insect ganglia. *Neurochem. Int.* 7:751-754

- Mansour NA, Eldefrawi ME, Eldefrawi AT (1977) Isolation of putative acetylcholine receptor proteins from housefly brain. *Biochemistry* 16:4126-4132
- Melamed J, Trujillo-Cenoz O (1968) The fine structure of the central cells in the ommatidia of dipterans. *J. Ultrastruct. Res.* 21:313-334
- Meyer EP, Matute C, Streit P, and Nässel DR (1986) Insect optic lobe neurons identifiable with monoclonal antibodies to GABA. *Histochemistry* 84:207-216
- Nässel DR, Hagberg M and Seyan HS (1983) A new , possibly serotonergic, neuron in the lamina of the blowfly optic lobe: an immunocytochemical and Golgi-EM study. *Brain Research* 280:361-367
- Nässel DR and Klemm N (1983) Serotonin-like immunoreactivity in the optic lobes of three insect species. *Cell Tiss. Res.* 232:129-140
- Negishi K, Teranishi T, Kato S (1982) Neurotoxic destruction of dopaminergic cells in the carp retina revealed by a histofluorescence study. *Acta Histochem. Cytochem.* 15:768-778
- Nicol D and Meinertzhagen IA (1982) An analysis of the number and composition of the synaptic populations formed by photoreceptors of the fly. *J. Comp. Neurol.* 207: 29-44
- Nistri A and Constanti A (1979) Pharmacological characterization of different types of GABA and Glutamate receptors in vertebrates and invertebrates. *Prog. Neurobiol.* 13:117-235

- Oertel WH, Schmechel DE, Mugnani E (1984) Glutamic acid decarboxylase (GAD):Purification, antiserum production, immunocytochemistry. In: Barker JL, Kelvy Mc (eds) Current methods in cellular neurobiology. Wiley J, New York, pp. 63-109
- Pages M, Jimenez F, Ferrus A, Peralta E, Ramirez G and Gelpi E (1983) Enkephalin-like immunoreactivity in *Drosophila melanogaster*. *Neuropeptides* 4:87-98
- Prives JM (1980) Nicotinic acetylcholine receptors. In: Schulster D and Levitzki A (eds) Cellular receptors for hormones and neurotransmitters. Wiley & Sons Ltd., Chichester New York Brisbane Toronto pp. 331-352
- Pujol JF (1984) Serotonin and GABA in Raphe neurons. In: Chan-Palay V, Palay SL (eds) Coexistence of neuroactive substances in neurons. Wiley & Sons, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore, pp. 45-61
- Rando RR and Bangerter FW (1977) The in vivo inhibition of GABA-transaminase by Gabaculine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 76:1276-1281
- Reynolds CP and Perez-Polo JR (1981) Ascorbic acid enhances the cytotoxic effect of 6-Hydroxydopamine for human neuroblastoma cell lines. *Neuroscience letters* 26: 151-155
- Rudloff E (1978) Acetylcholine receptors in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Exp. Cell Res.* 111:185-190

- Rudloff E, Jimenez F and Bartels J (1980) Purification and properties of the nicotinic acetylcholinereceptor of *Drosophila melanogaster*. In: Sattelle DB, Hall LM, and Hildebrand JG (eds) Receptors for Neurotransmitters, Hormones and Pheromones in Insects. Elsevier / North-Holland Biomedical Press, Amsterdam pp. 85-92
- Sachs C and Jonsson G (1975) Mechanism of Action of 6-Hydroxydopamine. *Biochem. Pharmacol.* 24:1-8
- Saint Marie RL and Carlson SD (1983) The fine structure of neuroglia in the lamina ganglionaris of the housefly, *Musca domestica* L. *J. Neurocytology* 12:213-241
- Sattelle DB (1980) Acetylcholine receptors of insects. In: Berridge MJ, Treherne JE and Wigglesworth VB (eds) *Advances in Insect Physiology* 15, Academic Press, London New York Sydney San Francisco, pp. 215-315
- Sattelle DB (1985) Acetylcholine Receptors. In: Kerkut GA, Gilbert I (eds) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* vol 11, Pergamon Press, Oxford New York Toronto Sydney Paris Frankfurt, pp. 395-434
- Schmidt J, Hunt S and Polz-Tejera G (1979) Nicotinic receptors of the central and autonomic nervous system. In: Essman WB (ed) *Receptors and Drug Action*. Spectrum Publication New York pp. 1-65
- Schmidt-Nielsen BK, Gepner JI, Teng NNH, Hall LM (1977) Characterization of an α -bungarotoxin binding component from *Drosophila melanogaster*. *J. Neurochem.* 29:1013-1029
- Shaw SR (1968) Organization of the locust retina. *Symp. zool. Soc. Lond.* 23:135-163

- Simmonds MA (1983) Multiple GABA receptors and associated regulatory sites. *TINS* 6:279-281
- Smola U, Meffert P (1979) The spectral sensitivity of the visual cells R 7 and R 8 in the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *J. Comp. Physiol.* 133:41-52
- Sternberger LA (1979) *Immunocytochemistry*. Wiley, New York
- Strausfeld NJ (1971) The organization of the insect visual system (Light Microscopy) I. Projections and arrangements of neurons in the lamina ganglionaris of Diptera. *Z. Zellforsch.* 121:377-441
- Strausfeld NJ (1976) *Atlas of an Insect Brain*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Strausfeld NJ, Nüssel DR (1981) Neuroarchitecture of brain regions that subserve the compound eyes of Crustacea and Insects. In: Autrum H (ed) *Vision in Invertebrates (Handbook of sensory physiology vol VII/6 B)* Springer, Berlin Heidelberg New York pp. 1-122
- Tapia R (1975) Biochemical Pharmacology of GABA in CNS. In: Iversen LL, Iversen SD and Snyder SH (eds) *Amino acid neurotransmitters (Handbook of psychopharmacology Vol 4)* Plenum Press, New York and London pp. 1-58
- Teichberg VI (1980) Amino acid receptors. In: Schulster D and Levitzki A (eds) *Cellular receptors for hormones and neurotransmitters*. Wiley & Sons Ltd., Chichester New York Brisbane Toronto pp. 369-395
- Timpe LC and Stuart AE (1984) Is γ -aminobutyric acid the neurotransmitter of barnacle photoreceptor. *Brain Res.* 307:225-232

- Timpe LC and Stuart AE (1985) Acetylcholine depolarizes Barnacle photoreceptors. *J. Exp. Biol.* 117:481-485
- Trujillo-Cenoz O (1965) Some aspects of the structural organization of the intermediate retina of dipterans. *J. Ultrastruct. Res.* 13:1-33
- Trujillo-Cenoz O (1985) The eye: development, structure and neural connections. In: Kerkut GA, Gilbert I (eds) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* vol 6, Pergamon Press, Oxford New York Toronto Sydney Paris Frankfurt, pp. 171-223
- Trujillo-Cenoz O and Melamed J (1970) Light and electron-microscope study of one of the systems of centrifugal fibres found in the lamina of muscoid flies. *Z. Zellforsch.* 110:336-349
- Truman JW, Taghert PH (1983) Insect neuropeptides. In: Krieger DT, Brownstein MJ, Martin TB (eds) *Brain peptides*. Wiley, New York pp. 165-181
- Walker RJ, Crossman AR, Woodruff GN and Kerkut GA (1971) The effect of bicuculline on the gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors of neurones of *Periplaneta americana* and *Helix aspersa*. *Brain Research* 33:75-82
- Watt CB, Su YYT, and Lam DMK (1985) Opioid pathway in an avian retina. II. Synaptic organization of enkephalin-immunoreactive amacrine cells. *J. Neuroscience* 5:857-865
- Weiler R and Ball AK (1984) Co-localization of neurotensin-like immunoreactivity and ³H-glycine uptake system in sustained amacrine cells of turtle retina. *Nature* 311: 759-761

- Yarowsky PJ and Carpenter DO (1977) GABA mediated excitatory responses on *Aplysia* neurons. *Life Science* 20: 1441-1448
- Yarowsky PJ and Carpenter DO (1978) Receptors for gamma-aminobutyric acid (GABA) on *Aplysia* neurons. *Brain Res.* 144:75-94
- Yazulla S, Studholme K, Wu JY (1986) Comparative distribution of ^3H -GABA uptake and GAD immunoreactivity in goldfish retinal amacrine cells: a double-label analysis *J. Comp. Neurol.* 244:149-162
- Zettler F and Weiler R (1976) Neuronal processing in the first optic neuropile of the compound eye of the fly. In: Zettler F and Weiler R (eds) *Neural principles in vision.* Springer, Heidelberg New York pp. 227-237
- Zimmerman P (1978) Field potential analysis and the physiology of second-order neurons in the visual system of the fly. *J. Comp. Physiol.* 126:297-316
- Zucker C, Yazulla S and Wu JY (1984) Non-correspondence of [^3H] GABA uptake and GAD localization in goldfish amacrine cells. *Brain Research* 298:154-158

LEBENS LAUF

Karl-Heinz Datum

Geboren am 16.4.1951 in Wasserburg/Inn als Sohn des Elektroingenieurs Karl Datum und seiner Frau Friederike

Herbst	1957	Eintritt in die Volksschule Schnaitsee
Herbst	1962	Übertritt in das Gymnasium Wasserburg/Inn
Juni	1971	Abitur am Gymnasium Wasserburg/Inn
Herbst	1971	Aufnahme des Studiums der Pädagogik an der Universität München
April	1972	Ziviler Ersatzdienst im Jugendheim
bis Juli	1973	Salesianum München
Herbst	1973	Aufnahme des Studiums der Biologie (Diplom) an der Technischen Universität München
Herbst	1978	Wechsel im Fach Biologie (Diplom) an die Universität München
Juli	1979	Bestehen der mündlichen Diplom-Biologen-Hauptprüfung
März	1982	Diplom in Biologie mit der Diplomarbeit: "Autoradiographische Untersuchungen mit der 2-Deoxyglucose-Methode an Sehzellen von <i>Calliphora erythrocephala</i> "
April	1982	Wissenschaftliche Hilfskraft in Forschung
bis Juli	1983	und Lehre am Zoologischen Institut der Universität München
ab Juli	1984	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Herrn Prof. F.Zettler an einem von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projekt

